

IMMUNCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM
ENTEROBACTERIAL COMMON ANTIGEN (ECA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Hella-Monika Kuhn
aus Wuppertal

1981

IMMUNCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM
ENTEROBACTERIAL COMMON ANTIGEN (ECA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau



vorgelegt von
Hella-Monika Kuhn
aus Wuppertal

1981

Dekan:	Prof. Dr. G. Feix
Leiter der Arbeit:	Dr. H. Mayer
Referent:	Prof. Dr. G. Drews
Korreferent:	Prof. Dr. K. Hilse

Tag der mündlichen Prüfung: 4.6.1981

Diese Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Immun-
biologie in Freiburg durchgeführt.



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Mayer, H., Kuhn, H.-M., Warth, R.:

The enterobacterial common antigen as an example of hexosaminuronic acid containing microbial surface antigens.

EUCHEM conference on polysaccharides from microorganisms
Stockholm (1979)

Kuhn, H.-M., Romanowska, E., Friebolin, H., Mayer, H.:

Newer results on the immunochemical characterization of the enterobacterial common antigen

FEMS symposium on microbial envelopes, Saimaanranta
(1980)

Kuhn, H.-M., Marx, A., Mayer, H.:

The lipid anchor of the enterobacterial common antigen (ECA)

Tagung der deutschen Sektion der ASM, Mainz (1981)

Ahamed, N.M., Kuhn, H.-M., Widemann, C., Mayer, H.:

Specific interactions of R-type lipopolysaccharides with lectins versus their non-specific reactivity with basic and hydrophobic proteins

4th Lectin Meeting, Copenhagen (1981)

Kuhn, H.-M., Adamus, G., Romanowska, E., Mayer, H.:

The effect of proteins on the immunogenicity of enterobacterial common antigen

Infect. Immun.; akzeptiert zur Publikation (1981)

Herrn Dr. Hubert Mayer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die Anleitung dieser Arbeit, für seine vielen Anregungen und die mir gewährte freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. G. Drews danke ich für seine wohl - wollende Kritik.

Frau Ch. Widemann danke ich für die hilfreiche Unterstützung.

Herrn R. Warth danke ich für die Untersuchungen am Aminosäureanalysator, Herrn D. Borowiak für die Aufnahme der Massenspektren.

Frau Dr. I. Fromme und Frau E. Metz danke ich für die Hilfe bei analytischen Untersuchungen.

Herrn R. Borowiak, Frau A. Gutmann und Frau U. Fischer danke ich für die Anzucht der Bakterien.

Herrn Prof. Friebolin danke ich für die Aufnahme des PMR-, Herrn Dr. Żugowski für die des NMR-Spektrums.

Frau Prof. E. Romanowska danke ich für die Überlassung ihrer ECA-Präparation aus Sh. sonnei, Herrn Dr. E. Neter für die Pseudomonas aeruginosa-Stämme.

Herrn H. Flammann danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen und Frau I. Himmelsbach für die Photoarbeiten.

Die finanzielle Unterstützung erfolgte durch die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V. .

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
B.	<u>EINLEITUNG</u>	4
1.	Die Zellhülle gram-negativer Bakterien	4
2.	Antigene der gram-negativen Zellhülle	8
2.1.	Lipopolysaccharid (O-Antigen)	9
2.2.	Kapselantigene	10
2.3.	Proteine der äußeren Membran	11
3.	Enterobacterial Common Antigen (ECA)	14
3.1.	Verbreitung von ECA	14
3.2.	Isolierung von ECA	16
3.3.	Chemische Zusammensetzung von ECA	17
3.4.	Immunogenität von ECA	20
3.5.	Genetische Determinierung von ECA und LPS	22
4.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	26
C.	<u>ERGEBNISSE</u>	30
I.	<u>Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von ECA</u>	30
I.1.	Isolierung von ECA durch verschiedene Methoden	30
I.2.	Behandlung von ECA mit Detergentien	33
I.3.	Konzentrationsreihe von ECA	35
I.4.	Bestimmung der kritischen Micellenkonzentration (cmc)	38
I.5.	Auftrennen von ECA durch Gelpermeationschromatographie	40

I.6.	Ca ⁺⁺ -Gehalt von ECA	47
I.7.	Zusammenfassung	49
II.	<u>Untersuchungen zum Fettsäureteil von ECA</u>	50
II.1.	Fettsäurezusammensetzung von ECA	50
II.2.	Lipidanker von ECA	57
II.2.1.	Isolierung des Lipidteils	57
II.2.2.	Identifizierung des Lipidteils durch Massenspektrometrie	58
II.2.3.	Bestimmung der Positionen der Fettsäuren im Diglycerid	63
II.2.4.	Bestimmung von Phospholipid	64
II.2.5.	Lipidteil von ECA aus <u>E. coli</u> K-12 und O8 ⁻ :K27 ⁻ (F470)	65
II.2.6.	Bindung des Lipidteils an das Aminosuckerpolymer	66
II.2.7.	Fettsäuregehalt von ECA nach Abspaltung des Lipidteils	71
II.3.	Modifizierung des Lipidteils	73
II.3.1.	Chemische Modifizierung	73
II.3.2.	Enzymatische Modifizierung	74
II.3.3.	Verhalten von ECA nach chemischer und enzymatischer Modifizierung	75
II.3.4.	Bestimmung der unteren Nachweisgrenze von ECA in der passiven Hämagglutination und in der Immunelektrophorese	79
II.4.	Zusammenfassung	80

III.	<u>Pseudomonas-fluid-factor (PF)</u>	83
III.1.	Isolierung von PF und Test der PF-Aktivität	83
III.2.	Wirkung von PF auf ECA	85
III.3.	Charakterisierung von PF	87
III.4.	Zusammenfassung	90
IV.	<u>Komplexierung von ECA mit Proteinen: Immunogenität von ECA/Protein-Komplexen</u>	92
IV.1.	Agar-Doppeldiffusionstest mit Proteinen	92
IV.2.	Untersuchungen am ECA/Protamin-Komplex	97
IV.3.	Immunisierung mit ECA/Protein-Komplexen	101
IV.4.	IgG-Anteil der Seren	104
IV.5.	Zusammenfassung	105
V.	<u>Untersuchungen am Aminosuckerpolymer von ECA</u>	106
V.1.	Elutionsprofil von ECA-Partialhydrolysaten im Aminosäureanalysator	106
V.2.	Methylierungsanalyse von ECA	112
V.3.	Versuche zur Identifizierung der terminalen Zucker	116
V.3.1.	Reaktion mit Lektinen	116
V.3.2.	Kopplung des reduzierenden Endes mit einer fluoreszierenden Komponente	117
V.3.3.	Nachweis von Glycerin	118
V.4.	^{13}C -NMR-Spektroskopie von ECA	119
V.5.	Charakterisierung eines Oligosaccharides aus Partialhydrolysaten von ECA	121
V.5.1.	Isolierung eines Oligosaccharides (Oligo A)	121

V.5.1.1.	Hydrolysebedingungen für die Isolierung	121
V.5.1.2.	Isolierung und Reinigung von OligoA	123
V.5.2.	Untersuchungen zur Struktur von Oligo A	125
V.5.2.1.	Hydrolysekinetik von Oligo A	125
V.5.2.2.	Methylierungsanalyse von Oligo A	125
V.5.2.3.	Protonenresonanz-Spektroskopie von Oligo A	127
V.6.	Zusammenfassung	129
D.	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION</u>	132
E.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	147
1.	Puffer	147
2.	Bakterien	147
2.1.	Kultivierung	147
2.2.	Verwendete Bakterienstämme	148
3.	Extraktionsmethoden	150
3.1.	PW/PCP-Extraktion	150
3.2.	Harnstoff-Extraktion	150
3.3.	Isolierung des PF-Faktors	150
4.	Physikalisch-chemische Methoden	151
4.1.	Chromatographische Methoden	151
4.1.1.	Papierchromatographie (PC)	151
4.1.2.	Hochspannungselektrophorese (HVE)	151
4.1.3.	Dünnschichtchromatographie (DC)	152
4.1.4.	Gaschromatographie (GC)	153
4.1.5.	Automatische Aminosäureanalyse	153
4.1.6.	Gelchromatographie	154

4.2.	Nachweis- und spektrometrische Methoden	155
4.2.1.	Anfärbungen	155
4.2.2.	Photometrische Bestimmungen	157
4.2.3.	Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie (GC/MS)	157
4.2.4.	Polarimetrie	158
4.2.5.	Atom-Absorptions-Spektrophotometrie	159
4.2.6.	Bestimmung der kritischen Micellenkonzentration = cmc	160
4.3.	Analytisch-chemische Methoden	161
4.3.1.	Hydrolysebedingungen	161
4.3.2.	Zuckerbestimmungen	161
4.3.3.	O-Acetylbestimmung	162
4.3.4.	Bestimmung von Phospholipid	163
4.3.5.	Formaldehydbestimmung	163
4.4.	Alkali-Behandlung	164
4.5.	Laktonisierung der Mannosaminuronsäure	165
4.6.	Reduktion bei konstantem pH	165
4.7.	Kopplung des reduzierenden Endes von Zuckern mit einer fluoreszierenden Komponente	166
4.8.	Methylierungsanalyse	167
4.8.1.	Methylierung	168
4.8.2.	Hydrolyse	170
4.8.3.	Reduktion	170
4.8.4.	Acetylierung	171
4.8.5.	N-Acetylierung	171

4.9.	Dephosphorylierung mit Flußsäure	172
4.10.	Lipidextraktion	172
4.11.	Deuteroacetylierung	173
4.12.	Perjodatoxidation	173
4.13.	Ionenaustauschersäule	173
5.	Enzymbehandlungen und -nachweise	174
5.1.	Phospholipase-Behandlung	174
5.2.	Lipase-Behandlung	174
5.3.	L-Aminosäure-Oxidase-Behandlung	175
5.4.	Esterase-Nachweis	176
5.4.1.	Esterase-Färbung	176
5.4.2.	Photometrischer Esterase-Nachweis	177
5.5.	Pseudomonas-fluid-factor	177
6.	Serologische Methoden	178
6.1.	Immunisierung	178
6.2.	Herstellung von Antiseren	180
6.3.	Serumabsorption	180
6.4.	Inaktivierung von IgM-Antikörpern	180
6.5.	Beladen von Erythrozyten mit Antigen	181
6.6.	Passive Hämagglutination	181
6.7.	Immunpräzipitation	182
6.7.1.	Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	182
6.7.2.	Immunelektrophorese	183
6.7.3.	Fused-Rocket-Immunelektrophorese	183
6.7.4.	Crossed-Immunelektrophorese	184
6.7.5.	Rocket-Immunelektrophorese	185

6.8.	Coomassie-Färbung	185
7.	Lektin-Test	186
8.	Herkunft der Enzyme und Chemikalien	186
F.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	189

Abkürzungen:

ECA	=	<u>E</u> nterobacterial <u>c</u> ommon <u>a</u> ntigen
LPS	=	Lipopolysaccharid
PF	=	Pseudomonas-fluid-factor
Glc	=	D-Glucose
GlcN	=	D-Glucosamin
GlcNAc	=	N-Acetyl-D-Glucosamin
ManN	=	D-Mannosamin
ManNUA	=	D-Mannosaminuronsäure
ManNacUA	=	N-Acetyl-D-Mannosaminuronsäure
TCA	=	Trichloressigsäure
DOC	=	Na-Desoxycholat
PW	=	Phenol/Wasser
PCP	=	Phenol/Chloroform/Petroläther
PHA	=	Passive Hämagglutination
cmc	=	<u>c</u> ritical <u>m</u> icelle <u>c</u> oncentration
GC/MS	=	Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie
m/e	=	Massenzahl/Elementarladung
HVE	=	Hochspannungselektrophorese
PMR	=	Protonenresonanzspektroskopie

A. ZUSAMMENFASSUNG

- Das Enterobacterial Common Antigen (ECA) zeigt in der Immunelektrophorese eine charakteristische "Vogelschwingen"-Präzipitation. Als Ursache dieses Doppelbogens konnte das Vorliegen eines Monomer/Micell-Gemisches ermittelt werden. Die Bildung von Micellen ist eine konzentrationsabhängige Eigenschaft. Neben Monomer und Micelle enthält ECA auch einen geringen Anteil an deacyliertem Monomer. Der hohe Ca^{++} -Gehalt von ECA deutet darauf hin, daß neben hydrophoben Kräften auch Ionenbindungen an der Bildung der ECA-Aggregate beteiligt sind.

- Ein Vergleich von ECA aus vier verschiedenen Stämmen von Enterobacteriaceae zeigte im wesentlichen Übereinstimmung in der Fettsäurezusammensetzung. Neben C16 als Hauptfettsäure traten auch zwei ungesättigte Fettsäuren auf: C16:1 und C18:1 (keine Δ^2 -ungesättigten Fettsäuren).

Durch Behandlung mit Flußsäure konnte der Lipidteil von ECA aus Salmonella montevideo SH94 abgespalten und mittels Massenspektrometrie als Phosphodiglycerid mit den Fettsäuren C16 in C1- und C16:1 (und C16; C18; C18:1 ?) in C2-Position identifiziert werden. Auch Escherichia coli K-12 und O8⁻:K27⁻ enthalten einen solchen Lipidteil. Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine Bindung des Lipidteils an C4 eines terminalen GlcN hin.

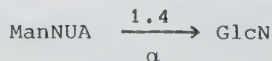
Modifizierung des Lipidteils hat keinen Einfluß auf die Antigenität von ECA, führt aber zu einer drastischen Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften. Im Zusammenhang mit diesen Versuchen konnte der Pseudo-

monas-fluid-factor als Esterase (oder Esterasengemisch) charakterisiert werden.

- Untersuchungen am Aminosuckerpolymer von isoliertem ECA zeigten, daß die "repeating unit" weitaus komplexer ist, als bisher angenommen wurde. Gegen ein Disaccharid als Wiederholungseinheit sprechen:
 - der Nachweis eines 3-0-Methyl-glucosaminitolacetates bei der Methylierungsanalyse. Dies läßt auf eine Verzweigung der Kette oder Substitution eines kettenständigen GlcNAc (mit einer noch nicht identifizierten Komponente) schließen.
 - das Auftreten von vier Signalen anomerer C-Atome im Verhältnis 1:2:1:1 bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie von ECA.
 - der Nachweis von mehr ManN als GlcN bei der Untersuchung von Hydrolysaten des carboxyl-reduzierten ECA im Aminosäure-Analysator.

Durch das charakteristische Elutionsprofil von ECA-Hydrolysaten im Aminosäure-Analysator (GlcN, ManNUA-GlcN-Disaccharid und ManNUA-Lakton) ist eine einfache Methodik zur Identifizierung von ECA (auch in Rohfraktionen) gegeben.

- Ein bei der Partialhydrolyse von ECA entstehendes Oligosaccharid wurde isoliert und mittels GC/MS-Analyse und PMR-Spektroskopie als Disaccharid der Struktur



identifiziert. Dieses Disaccharid stellt einen Teil der "repeating unit" dar.

- ECA läßt sich im Agar-Doppeldiffusionstest mit Proteinen präzipitieren. Gereinigtes ECA ist im Kaninchen nicht immunogen; durch Immunisierung mit einem ECA/Protamin-Komplex wurden hingegen Antiseren mit hohen ECA-Antikörper-Titern erhalten.

B. EINLEITUNG

1. Die Zellhülle gram-negativer Bakterien

Bakterienzellen sind von einer Cytoplasmamembran umgeben, an die sich nach außen die Zellwand anschließt.

Diese besteht bei

- gram-positiven Bakterien aus Peptidoglycan, Teichonsäure, Proteinen und anderen Polymeren
- gram-negativen Bakterien aus einer Peptidoglycan - schicht (rigid layer) und der äußeren Membran (OM).

Die beiden Membranen der gram-negativen Zellhülle erscheinen im Elektronenmikroskop als zwei Doppelschichten von je etwa 7,5 nm Dicke (110).

Trotz dieser Gemeinsamkeit unterscheiden sie sich sehr stark sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihrer Funktion.

Die Cytoplasmamembran ist die primäre Permeabilitäts - barriere der Zelle. Sie besteht aus ungefähr gleichen Mengen von Phospholipiden und Proteinen (116).

Die Phospholipide sind in einer lamellaren Doppelschicht angeordnet; vorherrschendes Phospholipid ist Phosphatidyläthanolamin (2). In die Phospholipidschicht ist eine große Zahl von Proteinen eingelagert; das Proteinnmuster der Cytoplasmamembran ist weitaus komplexer als das der äußeren Membran. Eine Vielzahl der Proteine sind Enzyme, die essentielle Reaktionen katalysieren: so finden sich in der Cytoplasmamembran die Enzyme der Atmungskette (125), Enzyme für den aktiven Transport (37; 52) und für die Biosynthese von Makromolekülen, z.B. von

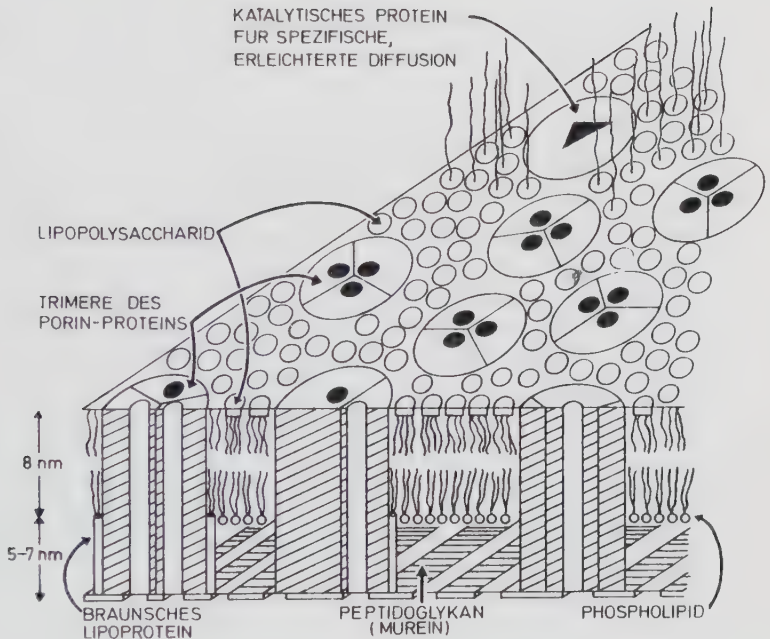


Abb. 1: Modell der Zellwand von Escherichia coli und Salmonella typhimurium (103)

Die Größenverhältnisse in der Abb. sind nicht maßstabsgerecht. Einige Aspekte des Modells wurden noch nicht experimentell nachgewiesen, so die Annahme, daß

- jedes Porinmolekül einen Kanal bildet
- das Braun'sche Lipoprotein mit Porin assoziiert
- das Braun'sche Lipoprotein nur über seine Kohlenwasserstoffkette mit der Membran verbunden ist
- zwischen der Peptidoglycanschicht und der Phospholipidebene ein erheblicher Abstand ist

Lipopolysaccharid (LPS) und von Phospholipiden (111; 166).

Die Peptidoglycanschicht, das Murein, ist mit für Form und Stabilität der Zelle verantwortlich (10; 130). Sie ist bei gram-negativen Bakterien einschichtig und macht etwa 10% des gesamten Zellwandmaterials aus (142). Peptidoglycan ist aus linearen Ketten von N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-muraminsäure in alternierender Reihenfolge aufgebaut. Die einzelnen Zuckerketten sind an der Muraminsäure mit Tetrapeptiden mit charakteristischen Aminosäuren (meso-Diaminopimelinsäure, D-Formen von Alanin und Glutaminsäure) substituiert, die wiederum miteinander verbunden sind. Die Peptidoglycanschicht ist durch das Braun'sche Lipoprotein mit der äußeren Membran verankert (11), aber auch durch nicht-kovalente Bindung mit den Matrixproteinen (19).

Die äußere Membran (OM) bildet eine Schutzbarriere, die den Angriff hydrolytischer Enzyme (z.B. Lysozym) auf das Murein verhindert und einem Austreten der periplasmatischen Enzyme entgegensteht. Gleichzeitig besitzt sie eine selektive Permeabilität für Nährstoffe und ausgeschiedene Metaboliten. Untersuchungen an E. coli und Salmonella haben gezeigt, daß das Eindringen hydrophober Substanzen (z.B. Gallensalze und verschiedene Antibiotika) bei Wildtypzellen durch die äußere Membran verhindert wird, wodurch sie den Darmbakterien ein Überleben in dieser Umgebung ermöglicht. Kleine, hydrophile Moleküle hingegen können über hydrophile Poren passiv durch die äußere Membran diffundieren (101; 102; 103).

Wie die Cytoplasmamembran so enthält auch die äußere Membran von Enterobacteriaceae Proteine und Phospholi-

pide, zusätzlich aber Lipopolysaccharid und das Enterobacterial Common Antigen (118; 126). Der Aufbau der äußeren Membran ist extrem asymmetrisch: Phospholipide und Lipoprotein finden sich bei Wildtypzellen nur in der inneren, LPS nur in der äußeren Lage der Doppelschicht (102). Die Phospholipid-Zusammensetzung entspricht in etwa der der Cytoplasmamembran, während die Anzahl der vorkommenden Proteinarten sehr viel geringer ist: bei E. coli, dem am besten untersuchten Bakterium, wurden etwa 5 Hauptproteine entdeckt, sowie 10-20 Minorproteine, die zum Teil nur in wenigen Kopien in der Zelle vorliegen (19). Während innerhalb der untersuchten Enterobacteriaceae Ähnlichkeiten im Proteinmuster beobachtet werden, zeigen andere gram-negative Bakterien (z.B. Pseudomonas aeruginosa) deutliche Abweichungen (44).

Viele dieser Proteine repräsentieren Rezeptoren für Phagen und Bacteriocine oder sind an der Aufnahme von Eisen, Vitaminen oder Zuckern (Maltose) beteiligt (19).

Ein besonderes Interesse erhält die äußere Membran als Träger von Stamm- oder Familien-spezifischen Antigenen und ihrer damit verbundenen Rolle bei der Auseinandersetzung mit dem Wirtsorganismus.

Die Außenseite der äußeren Membran zeigt im elektronenmikroskopischen Bild eine dichte Beladung mit Partikeln von 4-8 nm Durchmesser. Diese bestehen wahrscheinlich aus LPS-Aggregaten, die mit einem Hauptprotein komplexiert vorliegen (152).

Zwischen Cytoplasma- und äußerer Membran befindet sich

der periplasmatische Raum, der etwa 5-40% des Zellvolumens ausmachen kann (140). Er enthält eine Vielzahl von Bindungs- und Transportproteinen, Abbau-Enzymen und wahrscheinlich auch die als Membrane-derived-oligosaccharides (MDO) bezeichneten Oligosaccharide (51; 100; 113; 134).

Cytoplasmamembran und äußere Membran sind durch Anheftungspunkte (zones of adhesion) miteinander verbunden (20), durch die vermutlich frisch synthetisiertes LPS in die äußere Membran transportiert wird (92) und der Lipidaustausch stattfindet (50).

Häufig sind Bakterien noch von einer Kapsel oder Schleimschicht umgeben, die aus Polysacchariden oder Proteinen bestehen und die ebenfalls antigene Eigenschaften besitzen (4; 49; 109).

2. Antigene der gram-negativen Zellhülle

Wie bereits erwähnt, finden sich in der Zellhülle gram-negativer Bakterien viele Substanzen mit antigenen Eigenschaften. Einige dieser Antigene sollen im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

2.1 Lipopolysaccharid (O-Antigen)

Lipopolysaccharid (LPS) ist wohl das am besten untersuchte Antigen der gram-negativen Bakterien.

Lipopolysaccharide kommen in nahezu allen gram-negativen Bakterien vor und nehmen einen beträchtlichen Anteil der Zelloberfläche ein (45% der Oberfläche von S. typhimurium (136)). LPS ist ein amphipathisches Molekül und besteht aus drei kovalent miteinander verbundenen Regionen, die auch unter getrennter genetischer Kontrolle stehen: die hydrophobe Lipidkomponente (Lipid A) und die hydrophile Region, bestehend aus dem core-Oligosaccharid und den O-spezifischen Ketten.

Die O-Ketten zeigen große Variabilität sogar innerhalb eines Genus; ihre serologischen Spezifitäten wurden zur Klassifizierung vieler gram-negativer Genera (O-Serotypen) herangezogen (58).

Hingegen sind R-core und Lipid A-Region von geringer Variabilität. R-Mutanten zeichnen sich durch den Verlust der O-spezifischen Ketten aus.

Je nachdem, ob und wie weit zusätzlich auch der core geschädigt ist, werden die R-Mutanten in verschiedene Klassen eingeteilt bis hin zur Re-Mutante, deren Rest-core nur noch aus einem KDO-Trisaccharid besteht (68). Mit dem Verlust der O-spezifischen Ketten und damit der serologischen O-Spezifität geht das Auftreten einer R-Spezifität der Rahmutanten einher (5). Die Lipid A-Region ist der konservativste Teil des LPS-Moleküls: ein Disaccharid aus phosphoryliertem Glucosamin ist über Ester- und Amidbindungen mit Fettsäuren verbunden (charakteristisch: amidgebundene β -Hydroxyfettsäuren) und enthält oft zusätzlich Äthanolamin oder 4-Amino-L-Arabinose (69).

Abweichungen von dieser Struktur wurden z.B. bei photo-

synthetischen Bakterien gefunden (154). Lipid A ist Träger der endotoxischen Eigenschaften des LPS (letale Toxizität, Pyrogenität), wie durch Versuche mit isoliertem Lipid A gezeigt werden konnte (29).

2.2 Kapselantigene (K-Antigen)

Der Besitz einer Kapsel ist für Bakterien nicht lebenswichtig, macht aber manche pathogene Bakterien resistenter gegenüber Phagozytose und erhöht somit ihre Virulenz (31; 45). Kapselpolysaccharide besitzen hohe Antigenität.

Aus E. coli-Stämmen wurden bisher 100 verschiedene K-Antigene beschrieben; die meisten K-Antigene sind saure Polysaccharide, nur das K88- und K99-Antigen haben Protein-Natur. K-Antigene werden aufgrund ihres Verhaltens in drei Gruppen eingeteilt (57):

- K-Antigene der Gruppe L sind thermolabil und kommen in Kombination mit allen O-Antigenen vor
- Gruppe A ist thermostabil, tritt aber nur mit dem E. coli 08- und 09- Antigen auf
- Gruppe B ist ebenfalls thermostabil, kommt aber in Kombination mit allen O-Antigenen vor.

Der Wert einer Einteilung in L, A, B wird heute jedoch aufgrund neuerer Ergebnisse diskutiert und eine Neuordnung in zwei Gruppen (K-Antigene in Kombination mit 08, 09, 020 und 0101 sowie solche, die in allen anderen Kombinationen auftreten) vorgeschlagen (109).

2.3 Proteine der äußeren Membran

Der protektive Wert von Antikörpern gegen O- und K-Antigene ist durch ihre Serotyp- oder sogar Stammspezifität sehr eingeschränkt (55; 148).

Aus diesem Grunde wurde in zunehmendem Maße nach vielen Spezies gemeinsam, serologisch kreuzreagierenden Antigenen in der Zellhülle gesucht. Die Profile der Proteine der äußeren Membran zeigen in der SDS-Gelelektrophorese bei vielen Enterobacteriaceae Ähnlichkeiten (71; 133), so daß sie als mögliche kreuzreagierende Antigene in Frage kommen. Schwierigkeiten bei derartigen Untersuchungen ergeben sich aus der Kontamination isolierter Protein-Präparationen mit dem stark antigenen LPS (40). Dankert und Hofstra konnten 1977 erstmals den antigenen Charakter der Proteine der äußeren Schicht der äußeren Membran nachweisen (17).

SDS-Gelelektrophorese der Immunkomplexe zeigte ein vollständiges Muster der Hauptproteine sowie einige Minor-Proteine. Wurden absorbierte Seren (LPS-Antikörperfrei) verwendet, waren die Immunpräzipitate erheblich schwächer; jedoch war die Bildung von Immunkomplexen der Proteine mit den Seren eindeutig nachweisbar. Eine Entstehung der Immunkomplexe aufgrund von Antikörpern gegen K- oder H- (= Flagellen) Antigene konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. In einer weiteren Untersuchung (44) konnten die gleichen Autoren Kreuzreaktionen der Proteine der meisten E. coli-Serotypen zeigen. Die Kreuzreaktion mit drei weiteren Enterobacteriaceae war schwächer, aber dennoch sichtbar, während sie bei den Proteinen des nicht zu den Enterobacteriaceae gehörenden Pseudomonas aeruginosa fehlte.

Das Proteinmuster dieses Stammes hatte auch keine Ähnlichkeit mit den E. coli-Protein-Profilen.

Ebenfalls im Jahr 1977 wurde ein auch in gereinigter Form immunogenes Protein aus S. minnesota beschrieben, das bei gram-negativen Bakterien verschiedener Genera als gemeinsames Antigen nachgewiesen werden konnte (30). Dieses als k-Protein bezeichnete Protein zeichnet sich durch seine Neigung zur Komplexbildung mit LPS aus, wobei die Bindung im wesentlichen auf ionische Wechselwirkungen des basischen Proteins (pK 10.3) mit den Phosphatgruppen von Lipid A beruht.

Ein weiteres Protein der äußeren Membran, das in isolierter Form (auf Erythrozyten aufgezogen) oder bei Infektion mit Rahmutanten immunogene Eigenschaften besitzt, ist das Braun'sche Lipoprotein. Es ist mit 7×10^5 Kopien/Zelle ein Hauptprotein von E. coli und liegt zu 2/3 in freier Form, zu 1/3 kovalent an Peptidoglycan gebunden vor (8; 12; 48). Lipoprotein-freie Mutanten lassen auf eine wesentliche Rolle der gebundenen Form an der Erhaltung der Struktur der äußeren Membran schließen (41; 156).

In anderen Enterobacteriaceae konnten andere Lipoproteine nachgewiesen werden, die ebenfalls in freier und gebundener Form vorliegen (9; 34). Untersuchungen mit Antiseren gegen das E. coli-Lipoprotein ergaben Kreuzreaktionen mit den getesteten Enterobacteriaceae sowie mit einigen photosynthetischen Bakterien, aber keinerlei Reaktion mit vier weiteren, nicht zu den Enterobacteriaceae gehörenden gram-negativen Stämmen (94; 153).

Ein weiteres Antigen der Zellhülle gram-negativer Bakterien ist das im Jahre 1962 von Kunin entdeckte Common Antigen (63). Im Rahmen von Untersuchungen über Kreuzreaktionen von E. coli-Serotypen fand Kunin im E. coli 014-Antiserum eine vom O-Antigen unabhängige Spezifität, die mit nahezu allen getesteten E. coli-Serotypen in der

passiven Hämagglutination reagierte und später auch in verschiedenen anderen Enterobacteriaceae nachgewiesen werden konnte (3; 64). Wegen seiner Beschränkung auf diese Familie wird es heute als ECA (= Enterobacterial Common Antigen) bezeichnet. Immunchemische Aspekte dieses Antigens sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit, daher soll dieses Antigen im folgenden Abschnitt näher besprochen werden.

3. Enterobacterial Common Antigen (ECA)

3.1 Verbreitung von ECA

Wie bereits erwähnt, ist das Vorkommen von ECA auf gram-negative Organismen und unter diesen nahezu gänzlich auf die Enterobacteriaceae beschränkt.

Alle bisher untersuchten Wildtypen von Enterobacteriaceae mit Ausnahme von Erwinia chrysanthemi enthalten dieses Antigen. Da ECA jedoch in anderen Erwinia Spezies vorhanden ist und zudem eine Aufteilung des Genus Erwinia diskutiert wird (16; 138), ist es fraglich, ob das Fehlen von ECA in Erwinia chrysanthemi wirklich als " Ausnahme " zu werten ist. Die taxonomische Stellung der ECA-haltigen, aber zu den Vibrionaceae gerechneten Art Plesiomonas shigelloides ist ebenfalls nicht eindeutig (16). Aeromonas hydrophila 209A ist der einzige ECA-haltige von 22 getesteten Stämmen dieser Spezies (89).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Verbreitung von ECA in gram-negativen Bakterien.

Ein 1976 durchgeführter Vergleich des ECA-Gehaltes von 184 verschiedenen Stämmen zeigte erhebliche Unterschiede (56). Zur Gruppe mit dem höchsten ECA-Gehalt gehören Shigella, Citrobacter und Enterobacter; der Gehalt an ECA war am niedrigsten bei Proteus, Providencia und Serratia. Salmonellen, zu denen der hier untersuchte Stamm SH94 gehört, haben durchschnittlich nur ein Drittel des ECA-Gehaltes der Shigella-Gruppe.

3.2 Isolierung von ECA

Während früher benutzte Isolierungsmethoden nur zu einer Anreicherung von ECA führten (89), konnten Männel und Mayer (79) und Zugowski und Romanowska (70) gereinigtes ECA in guter Ausbeute isolieren. Das in dieser Arbeit verwendete Material ist, sofern nicht anders angegeben, aus S. montevideo SH94 durch die kombinierte Phenol/Wasser - Phenol/Chloroform/Petroläther-Methode nach Männel und Mayer (79) isoliert worden. Diese Methode ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

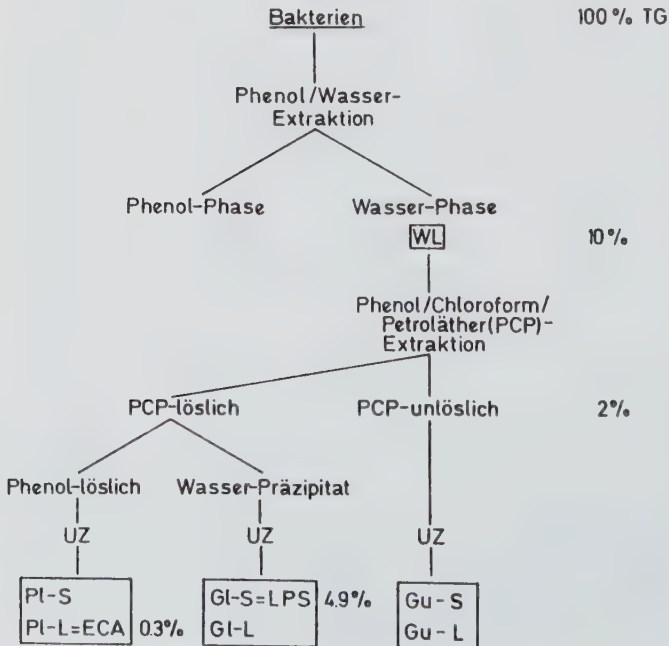


Abb.2: Kombinierte PW/PCP-Methode zur Extraktion von ECA
(79)

3.3. Chemische Zusammensetzung von ECA

Bei den früheren Beschreibungen der chemischen Natur und des biologischen Verhaltens von ECA zeigten sich erhebliche Differenzen zwischen den verschiedenen Präparationen (75). Diese Unterschiede lassen sich vermutlich auf zwei Eigenschaften von ECA zurückführen: seine hohe Oberflächenaktivität und sein Vorkommen in zwei immunologisch unterschiedlichen Formen (s. B.3.4.). So wurde möglicherweise Zellmaterial (Protein, RNA), das aufgrund der Oberflächenaktivität von ECA mit diesem gemeinsam isoliert wurde, wegen der ECA-Aktivität der Fraktion als Bestandteil von ECA gesehen. Zum anderen ergaben sich selbst bei Verwendung des gleichen Stammes Diskrepanzen in der Zusammensetzung des ECA-Materials, je nachdem, ob die freie oder die gebundene Form isoliert wurde (36; 64).

Die Analyse des nach der PW/PCP-Methode gewonnenen Materials (B.3.2.) führte zu einer von den früheren Untersuchungen abweichenden Vorstellung: ECA ist ein lineares Aminosäurepolymer aus alternierenden Einheiten von N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-mannosaminuronsäure, das zu einem geringen Teil mit Palmitin- und Essigsäure verestert ist. Aufgrund des Molekulargewichtes des Monomers von 2700 werden 8-10 Zuckereinheiten angenommen (79). Das Material zeigt die für ECA beschriebenen biologischen Eigenschaften und seine Identität mit dem Kunin-Antigen konnte durch Untersuchungen mit ECA-negativen Mutanten bewiesen werden (80; 81). Die Bedeutung der Mannosaminuronsäure -die als seltener Zucker sonst nur als Bestandteil des K7- und K56-Antigens von E. coli bekannt ist (24; 86)- als wesentliche Komponente der serologischen Determinante von ECA zeigte sich nach Veresterung der Carboxylgruppe: derart behandeltes ECA verlor seine Präzipitationsfähigkeit mit ECA-Antiserum; durch Verseifung

konnte sie wieder hergestellt werden (78).

Wie sich am Präzipitationsmuster in der Immunelektrophorese beobachten läßt, ist ECA nicht homogen; eine Alkali-Behandlung des Materials führte jedoch zu einer einheitlichen Linie (Abb. 3). Gleichzeitig geht bei der Alkalisierung ein Verlust der Fähigkeit zum Aufziehen auf Erythrozyten einher. Wahrscheinlich ist die Inhomogenität der Präzipitation auf die Bildung von ECA-Aggregaten zurückzuführen, die nach Abspaltung der ester gebundenen Fettsäuren nicht mehr möglich ist. Ein entsprechendes Verhalten wurde z.B. für Lipoteichonsäure von Streptococcus pyogenes beschrieben, bei der der Fettsäureanteil ebenfalls gering ist (1.5%), aber für Micellenbildung und Sensibilisierung von Erythrozyten unerlässlich (123).

Die chemische Charakterisierung des auf einem gänzlich anderen Weg der Isolierung erhaltenen ECA aus Shigella sonnei durch Zugowski und Romanowska (70) bestätigte im wesentlichen die Ergebnisse von Männel und Mayer, wick



Abb. 3: Präzipitationsmuster in der Immunelektrophorese von ECA aus Salmonella montevideo SH94 vor und nach Alkalisierung (80)

ECA = 0.1%

ECAalk = 0.1%, Alkali-behandelt

aber in einzelnen Punkten davon ab (z.B. Gehalt an Aminosuktern, bessere Löslichkeit). Tabelle 2 gibt im Vergleich die Analysendaten beider Präparationen wieder.

	<u>S.montevideo</u> SH94**	<u>Sh.sonnei</u> 9773 (Phase I)*
Aminosucker gesamt (D-GlcN) (D-ManNUA)	45-50 % (23-25)% (23-25)%	62.9 % (19.5)% (43.4)%
N-Acetyl	11.7 %	15.7 %
O-Acetyl	1.3 %	3.6 %
Fettsäuren gesamt (C16:0) (C18:1)	2.5 % (2.0) % (±)	3.2 % (+) (+)
Phosphat	0,47 %	P 0.5%
Neutralzucker	-	1.6%
Aminosäuren	-	4.0%
Gesamt	70 %	90 %
Löslichkeit in Wasser (25°C)	0.3%	10 %
Ausbeute	0.3%	0.2-0.25%

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des isolierten ECA aus Salmonella montevideo SH94 und Shigella sonnei 9773 in Prozent des Bakterien-Trockengewichtes (89)

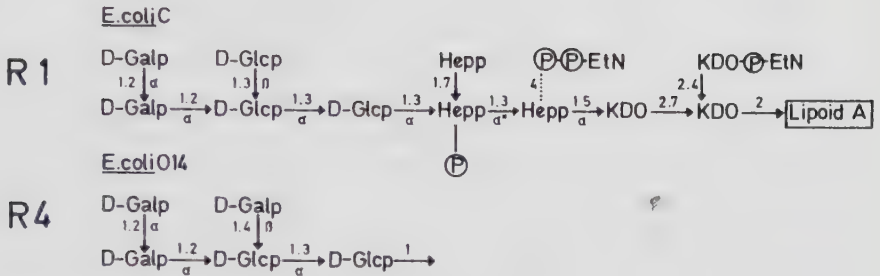
* Daten von Ługowski und Romanowska (70)

** Daten von Männel und Mayer (89)

3.4 Immunogenität von ECA

Hinweise auf das Vorkommen von ECA in serologisch unterschiedlichen Formen ergaben sich bereits aus den Untersuchungen Kunins, da er das Antigen zwar in nahezu allen getesteten Stämmen nachweisen, Antikörperbildung gegen ECA aber nur mit E. coli 014 erzielen konnte. Neter et al. (96) konnten nachweisen, daß diese Unterschiede nicht auf den verschiedenartigen ECA-Gehalt in den Stämmen zurückzuführen sind. Beim Versuch, ECA und O-Antigen mit 85%igem Äthanol zu trennen, stellten Suzuki et al. fest, daß in nicht-immunogenen Stämmen eine vollständige Trennung möglich ist (143), nicht jedoch beim immunogenen E. coli 014:K7. Dieser enthält sowohl Äthanol-lösliches als auch unlösliches ECA, wobei die Immunogenität auf die Äthanol-unlösliche Fraktion beschränkt ist (145). Umfassende Untersuchungen mit immunogenem ECA führten letztlich zu dem Schluß, daß für die ECA-Immunogenität eine Bindung an LPS Voraussetzung ist; dabei muß der R-core vollständig sein und dem R1- oder R4-Typ angehören (89). Das Vorliegen einer kovalenten Bindung von immunogenem ECA an den R-core konnte schließlich durch Hemmung der ECA-Hämagglutinationsreaktion durch LPS verschiedener R1-core Mutanten sowie durch Studien mit radioaktiv-markierten Aminosukzern gezeigt werden (62). Die chemische Struktur der beiden core-Typen ist bekannt (siehe Abb. 4). Beide besitzen eine identische terminale Tetrasaccharidkette, die beim R1-core mit einer β -1.3-gebundenen Glucose, beim R4-core mit einer β -1.4-gebundenen Galaktose substituiert ist. Serologische Kreuzreaktionen zwischen R1- und R4-Mutanten lassen sich aus dieser Ähnlichkeit erklären (87; 88). Essigsäure-Degradierung führt zur Zerstörung der ECA- und R-Immunogenität und zum Auftreten der sonst kryptischen

IMMUNOGENE STÄMME:



NICHT-IMMUNOGENE STÄMME:

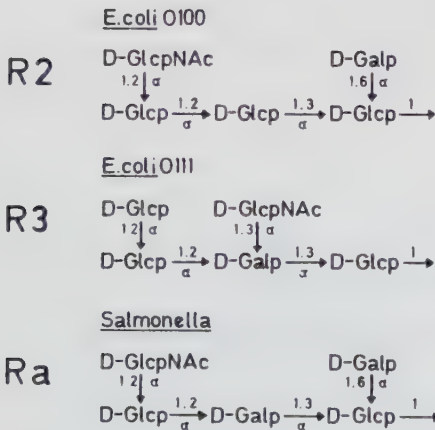


Abb. 4: Schematische Darstellung der LPS-core-Typen in ECA-immunogenen und nicht-immunogenen Stämmen (1)

Modifiziert nach Lindberg (in Vorbereitung)

* α -Hep = L-glycero- α -D-mannoheptose

EtN = Äthanolamin

P = Phosphat

p = pyranosidisch

KDO = 2-Keto-3-desoxy-octonsäure

Lipid A-Immunogenität (118).

Die Beschränkung der Immunogenität von ECA-immunogenen Stämmen auf die LPS-gebundene (Äthanol-unlösliche) Form wurde bereits erwähnt. Überraschenderweise war das LPS-freie, Äthanol-lösliche ECA (Rohfraktion) von nicht-immunogenen Stämmen im Kaninchen ebenfalls immunogen (143). Wurden Äthanol-lösliches ECA und Äthanol-unlösliches LPS der nicht-immunogenen Stämme in verschiedene Venen gespritzt, blieb die Immunogenität des ECA erhalten. Bei Injektion eines Gemisches von beiden blieb jedoch die Immunantwort aus (141). Der gleiche Hemmeffekt konnte mit Lipid A, verschiedenen Lipiden und sogar mit Serum beobachtet werden (161; 163; 164). Um den notwendigen Kontakt von Antigen und Hemmstoff zu unterstreichen, wurde dieses Phänomen von Whang und Neter "antigen-associated immunosuppression" genannt (164).

3.5. Genetische Determinierung von ECA und LPS

Die für die ECA-Synthese bisher bekannten Genorte sind in Abb. 5 zu sehen.

Untersuchungen zur genetischen Determinierung von ECA zeigen eine starke Verknüpfung mit der LPS-Synthese. Die Biosynthese der Oligosaccharideinheiten der O-spezifischen Ketten werden vom rfb-Genort kontrolliert, Synthese und Transfer der core-Zucker von den rfa-Genen (141). Mutationen im rfb-Genort sind Voraussetzung für die Immunogenität von ECA, da dieses nur bei Fehlen der O-Ketten auf den R1- oder R4-core übertragen werden kann (76).

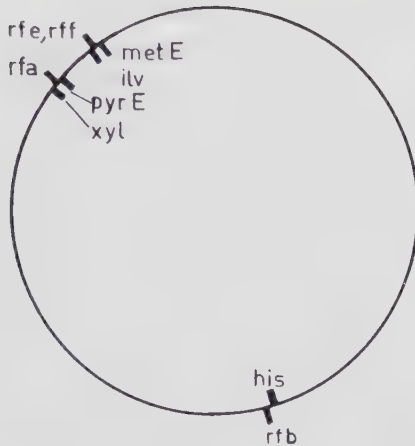


Abb. 5: Stark vereinfachtes *S. monteideo* Chromosom mit den Genorten für ECA- und LPS-Synthese (75)

Mutationen im rfa-Gen führen zu einem inkompletten core und verhindern damit die Immunogenität von ECA (siehe B.3.4.). Teil des rfa-Genclusters ist das rfaL-Gen, das an der Übertragung der O-Ketten auf den core beteiligt ist. Auch eine Mitwirkung an der Übertragung von ECA auf den R1- und R4-core und damit an der Immunogenität von ECA konnte für dieses Gen nachgewiesen werden: Mutanten mit defektem rfaL besaßen zwar einen kompletten core und freies ECA, waren aber nicht immunogen (131).

Bei *S. monteideo* und *S. minnesota* sowie verschiedenen *E. coli*-Serotypen nehmen auch rfe-Gene an der Synthese der O-Ketten teil (74; 132). Eine Mutation in diesem Gen führt ebenfalls zum Verlust von ECA. Das rfe-Genprodukt konnte bisher nicht identifiziert werden, doch wird eine mögliche Rolle bei der Synthese eines "antigen

carrier lipids" diskutiert (72).

Ein weiterer Genort für die Synthese von ECA (aber ohne Einfluß auf LPS) ist der rff-Gencluster, der in unmittelbarer Nähe von rfe und ilv liegt (73). rff-Gene sind an der Biosynthese der Mannosaminuronsäure beteiligt; sie kontrollieren die Funktion einer Epimerase (rffE) und einer Dehydrogenase (rffD). Die Biosynthese von Mannosaminuronsäure wurde in E. coli (47; 59) und in S. typhimurium (66) untersucht. In Abb. 6 ist ein Schema dieser Synthese unter Beteiligung der rff-kontrollierten Enzyme dargestellt. Untersuchungen der ECA-negativen rff-Mutanten ergaben einen Defekt in der NAD^+ -abhängigen Dehydrogenase und nur in einem Fall zusätzlich einen Epimerase-Defekt (66).

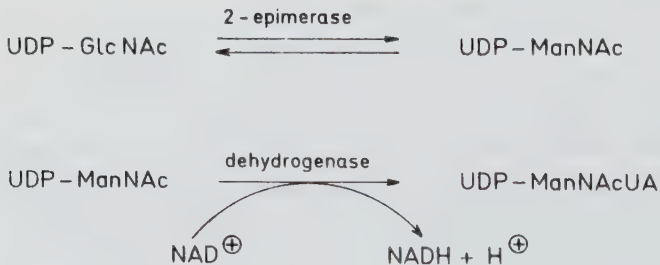


Abb. 6: Biosynthese der N-Acetyl-D-Mannosaminuronsäure
(59)

In Abb. 7 ist der Einfluß von rf.-Mutationen bei R1- und R4-core-Typen auf Synthese und Immunogenität von ECA dargestellt.

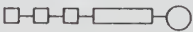
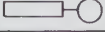
<u>Mutation</u> in	<u>Mutation</u> Effekt	<u>LPS -Struktur</u>	<u>ECA</u> Präsenz in Bakterien	<u>ECA</u> Immunoge- nität
—	—	O-Kette Core Lipid A 	+	—
rff	ECA Synthese		—	—
rfb	O-Ketten Synthese	ECA 	+	+
rfe	?????		—	—
rfaL	ECA und O-Ketten Translokation		+	—
rfa	Core Synthese		+	—

Abb. 7: rf.-Mutationen und ihr Einfluß auf ECA und LPS von R1- und R4-core-Typen (89)

4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Während frühere Untersuchungen an ECA seiner Isolierung, der chemischen Identität, der Lokalisierung in der Bakterienzelle und seinen serologischen und immunologischen Eigenschaften galt, wandte sich das Interesse neuerer Untersuchungen der chemischen Feinstruktur von ECA zu. Sein Löslichkeitsverhalten sowie seine Zusammensetzung aus (hydrophilem) Zuckerteil und (hydrophobem) Fettsäureteil charakterisieren ECA als amphipathisches Makromolekül. Bisher wurde jedoch nur der Zuckerteil von ECA (durch Methylierungsanalyse) näher untersucht; über den Lipidteil ist systematisch noch nicht gearbeitet worden.

a) Charakterisierung des Lipid-Anteils von ECA

Wie bereits beschrieben, enthält hochgereinigtes ECA immer einen Anteil an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Obwohl deren Anteil gering ist (ca. 3%), sind sie offensichtlich von besonderer Bedeutung für die Eigenschaften von ECA: so verliert ECA nach ihrer Abspaltung durch alkalische Hydrolyse die Affinität zu Zelloberflächen. Die Frage der Lokalisation der Fettsäuren im ECA-Molekül wurde bisher noch nicht geklärt, doch war ein Hinweis auf einen separaten Lipidteil durch Beobachtungen von Marx und Mayer (84) gegeben, daß Einwirkung von Phospholipase A₂ ebenfalls die Affinität von ECA zu Zelloberflächen beeinflusst. Marx und Petcovici (85) schlugen für den Lipidteil von ECA die Struktur eines Phosphoglycerides vor, doch konnte ein Beweis für eine derartige Struktur bisher nicht erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit sollte der Lipidteil von freiem ECA isoliert und seine Struktur untersucht werden.

b) Modifizierung des Lipid-Teils von ECA durch chemische oder enzymatische Methoden

Unter der Voraussetzung, daß ECA einen separaten Lipid-Teil besitzt, sollte es durch Alkali-Behandlung oder Einwirkung von Lipasen und Phospholipasen möglich sein, eine Modifizierung oder Zerstörung der sich von der hydrophoben Teilstruktur ableitenden Eigenschaften zu erreichen, ohne die Antigenität von ECA zu beeinflussen. Die Wirkung derartiger Modifizierungen auf Aggregationsverhalten, Oberflächenaktivität usw. sollte untersucht werden. Im Zusammenhang damit sollte der Frage der Wirkung und Natur des "Pseudomonas-fluid-factor" (PF-Faktor) nachgegangen werden. Dieser hitzelabile Faktor wurde von Whang und Neter zufällig in Kulturfiltraten von Ps. aeruginosa-Kulturen entdeckt und zeichnet sich durch seine selektive "Zerstörung" des Äthanol-löslichen ECA's aus (160).

c) Komplexierung von ECA mit Proteinen: Immunogenität von ECA/Protein-Komplexen

Isoliertes und gereinigtes ECA ist bei i.v.-Immunisierung von Kaninchen nicht oder nur sehr schwach immunogen (70; 89), wohingegen Rohfraktionen immunogen sind, z.B. Äthanol-fraktionierte Überstände erhitzter Bakterienkulturen (143). Domingue und Johnson (22) erhielten aus ECA-haltigen, nicht-immunogenen Stämmen durch Zellzertrümmerung und Zentrifugation subzelluläre Fraktionen, die bei Immunisierung von Kaninchen eine gute Immunantwort ergaben. Die ECA-Immunogenität dieser Fraktionen konnte durch Erhitzen zerstört werden, obwohl die ECA-Antigenität selbst bei Autoklavieren bei 120°C erhalten bleibt; dies wies darauf hin, daß ECA in diesen Präparationen mit einem hitzelabilen Partner assoziiert vorliegt. Der hohe Proteingehalt

(15%) eines ebenfalls immunogenen ECA-Präparates von Marx und Petcovic (85) deutet auf ein Protein als assoziierenden Partner hin.

Das von R. Geyer (30) beschriebene, bei Enterobacteriaceen weitverbreitete k-Protein präzipitiert mit LPS und Lipid A, wobei die Bindung im wesentlichen auf ionische Wechselwirkungen des basischen Proteins mit den Phosphatgruppen von Lipid A beruht. Da ECA in weit stärkerem Maße negativ geladen ist (N-Acetylaminuronsäure als Hauptbestandteil) als LPS, sollte versucht werden, ob ECA mit basischen Proteinen ebenfalls komplexieren kann. Solche Komplexe sollten dann im Tierversuch eingesetzt werden, um die Immunogenität von ECA/Protein-Komplexen zu testen.

d) Charakterisierung von Oligosacchariden aus Partialhydrolysaten von ECA

In Abschnitt B.3.3. wurde bereits dargelegt, daß nach den Arbeiten von Männel und Mayer (79) die Zuckerkomponente von ECA als lineares Polysaccharid aus alternierenden Einheiten von GlcNAc und ManNAcUA aufzufassen ist. Zugowski und Romanowska (70) fanden jedoch in ihrem aus Shigella isolierten Produkt, dessen serologische Identität mit dem ECA von Männel und Mayer durch Absorptionsstudien nachgewiesen wurde, ein 1:2 Molverhältnis der beiden Aminosucker. PMR-Studien, die von Männel und Mayer in Zusammenarbeit mit Prof. Friebolin, Heidelberg, durchgeführt wurden (79), ließen zwar nur ein anomeres α -Proton erkennen, doch da der β -Bereich nicht zu analysieren war, konnte durch die PMR-Studien keine Aufklärung der Größe der "repeating unit" erhalten werden. Daher ergab sich die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur chemi-

schen Struktur von ECA. In dieser Arbeit wurde der Weg der Strukturaufklärung über Teilstrukturen gewählt: eines der bei der Partialhydrolyse von ECA in guter Ausbeute entstehenden Oligosaccharide sollte isoliert und charakterisiert werden.

In neuester Zeit sind Gaschromatographie-Säulentypen erhältlich, die bis zu 300°C Säulen- und Trenntemperatur eingesetzt werden können. Auf diesen Säulen wurden gute Auftrennungen von Oligosacchariden aus Amino-zuckern erhalten. Mit dem isolierten Material sollte versucht werden, ob auf diesen Säulen auch permethylierte aminuronsäure-haltige Oligosaccharide getrennt und in Kombination mit Massenspektrometrie die Bindungsstellen bestimmt werden können. PMR-Analysen sollten zur Charakterisierung der anomeren Bindung eingesetzt werden.

C. ERGEBNISSE

I. Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von ECA

I.1. Isolierung von ECA durch verschiedene Methoden

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, zeigt ECA in der Immunelektrophorese keinen einheitlichen Präzipitationsbogen, sondern einen als " Vogelschwinge " bezeichneten Doppelbogen (siehe Abb. 3).

Um der Frage nachzugehen, ob die beiden Bögen zwei Komponenten des ECA darstellen, wurde versucht, ECA mit verschiedenen Methoden zu isolieren und zu überprüfen, ob es möglich ist, die Komponenten unabhängig voneinander zu isolieren. Zusätzlich sollte bei diesem Versuch der Frage nachgegangen werden, ob das bereits 1961 von Brodhage (13; 14) mit Harnstoff aus diversen Enterobacteriaceae isolierte " C-Antigen " mit dem Kunin - Antigen (ECA) identisch ist.

Zur Isolierung wurden jeweils 1.5 g lyophilisierte S. monteideo SH94-Zellen/10ml eingesetzt. Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen abzentrifugiert und die Überstände getestet. Die Identität des Materials mit ECA wurde in der passiven Hämagglutination und in der Präzipitation mit monospezifischem ECA-Antiserum getestet. Zudem wurde in der Hochspannungselektrophorese überprüft, ob die typischen Zucker GlcN und ManNUA (bzw. das ManNUA-Lakton) enthalten sind.

Eine Zusammenstellung der verschiedenen Behandlungen sowie der Ergebnisse findet sich in Tabelle 3.

Bezeichnung	A.	B.	Überstand		
	Isolierung mit	Inkubation	HVE GlcN/ManNUA	PHA	Präzipitation
20°CEx	NaCl 0.9%	20°C/ 1h	+	+	— •
37°CEx	"	37°C/ "	+	+	— •
60°CEx *	"	60°C/ "	+	+	— •
HÜ	"	100°C/ "	+	+	— •
Urea	Harnstoff *	37°C/72h	+	+	— •
37°Cdest	dest. H ₂ O	37°C/ 1h	+	+	— •

Tabelle 3: Isolierung von ECA aus Salmonella monteideo mit verschiedenen Methoden

Je 1.5 g lyophilisierte Zellen/10 ml A
*2g Harnstoff/10 ml NaCl 0.9% (s. E.3.2.)

Nach Inkubation (B) wurden die Zellen bei 7000xg abzentrifugiert (*= + 48h Dialyse des Überstandes)

HVE: 100µl Überstand (4N HCl/1h 100°C);
HVE 1h, pH 2.8; Trevelyan-Färbung

PHA: 100µl Überstand/25µl Erythrozyten in 5ml NaCl 0.9%

Immunelektrophorese: 10µl Überstand/1h

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387), absorbiert mit E. coli O14 (F1327).

Es zeigte sich, daß mit allen getesteten Methoden inclusive der Harnstoffextraktion nach Brodhage ECA gewonnen werden kann (Reaktion mit monospezifischem ECA-Antiserum). Mit Ausnahme des bei 100°C extrahierten Materials (HÜ in Tab. 3) trat in der Immunelektrophorese jedoch nur der schneller wandernde Bogen des ECA-Doppelbogens auf. Wurden jedoch die vorextrahierten Zellsedimente erneut aufgenommen und bei 100°C inkubiert, zeigte sich auch bei den übrigen Proben der typische Doppelbogen. Zur Isolierung des langsam-wandernden Materials schien also eine " kräftige " Extraktionsmethode wie PW/PCP oder Kochen nötig zu sein.

Alkali-behandeltes ECA zeigt, wie seit längerem bekannt ist, ebenfalls nur einen Bogen in der Immunelektrophorese. Aus diesem Grund wurde das bei 37°C extrahierte Material (37°C-Ex) auf seinen Fettsäuregehalt geprüft. Da sich Fettsäuren nachweisen ließen (1.65%) und das Material zudem die Fähigkeit zur Erythrozyten-Sensibilisierung besitzt (Tab. 3), konnte das Vorliegen von deacyliertem ECA ausgeschlossen werden (alkalisiertes ECA hat diese Fähigkeit verloren). Andererseits waren aber mit den beiden Aminosuktern und Palmitinsäure trotz Fehlen des langsam-wandernden Bogens die wesentlichen ECA-Bestandteile in diesem Material enthalten.

Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, daß die beiden Bögen in der Immunelektrophorese die monomere und die aggregierte Form von ECA darstellen könnten. Ein weiterer Hinweis in diese Richtung war durch die Ähnlichkeit im Verhalten von ECA und den ebenfalls amphipatischen Lipoteichonsäuren gegeben:

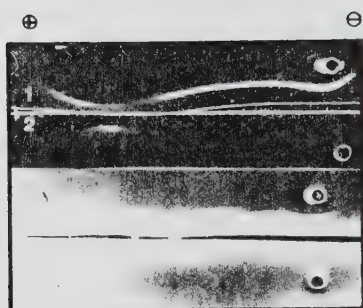
auch Lipoteichonsäuren zeigen in der Immunelektrophorese ein " Vogelschwingen "-Muster, das nach Alkali-Behandlung in einen Einzelbogen übergeht. Von Lipoteichonsäuren ist bekannt, daß sie in einer hochmolekularen Micellenform und in einer niedermolekularen (deacylierten) Form vorkommen (168).

I.2. Behandlung von ECA mit Detergentien

Um nachzuprüfen, ob die langsam-wandernde ECA-Fraktion in der Immunelektrophorese aggregiertes ECA darstellt, wurde PW/PCP-extrahiertes ECA mit Na-Desoxycholat und Triton-X 100 (1% in Tris-Puffer, 10mM, pH 7.5) eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann in der Immunelektrophorese das Präzipitationsmuster überprüft. Beide derart behandelten Proben zeigen nur noch einen Bogen in der Immunelektrophorese (Abb. 8). Wurde Na-Desoxycholat aus der Probe durch Dialyse entfernt (24h gegen Tris-Puffer, 10mM, pH 7.5), trat eine fast vollständige Reaggregation des ECA auf (Abb. 8).

Bei Einsatz des reaggregierten Materials in der passiven Hämagglutination war kein Unterschied zwischen der Detergenz-behandelten Probe und der nicht-behandelten Kontrolle festzustellen.

Aufgrund dieses Ergebnisses kann also angenommen werden, daß das " Vogelschwingen "-Muster von ECA auf dem Vorliegen einer Mischung von Monomeren und ECA-Aggregaten beruht.



ECA = 0.5 %

Abb. 8: Detergentien-behandeltes ECA von Salmonella
montevideo SH94 in der Immunelektrophorese

1 = ECA (Kontrolle)

2 = ECA nach Behandlung mit 1% Triton X-100

3 = ECA nach Behandlung mit 1% Na-Desoxycholat
sowie anschließender 24stündiger Dialyse
gegen Tris-Puffer (10mM; pH 7.5)

4 = ECA nach Behandlung mit 1% Na-Desoxycholat

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387)

I.3. Konzentrationsreihe von ECA

Im Gegensatz zur Lipoteichonsäure, bei der neben Micellen das Monomer in deacylierter Form vorliegt, enthielt der bei 37°C gewonnene Extrakt -wie schon erwähnt- Fettsäuren. Es stellte sich also die Frage, warum dieses Material nicht auch aggregieren konnte. Von Detergentien ist die Abhängigkeit der Micellbildung von der Konzentration bekannt; erst bei Überschreiten einer für jedes Detergenz spezifischen Konzentration, der sogenannten cmc (= critical micelle concentration), werden Micellen gebildet. Durch Einsatz einer Konzentrationsreihe von ECA in der

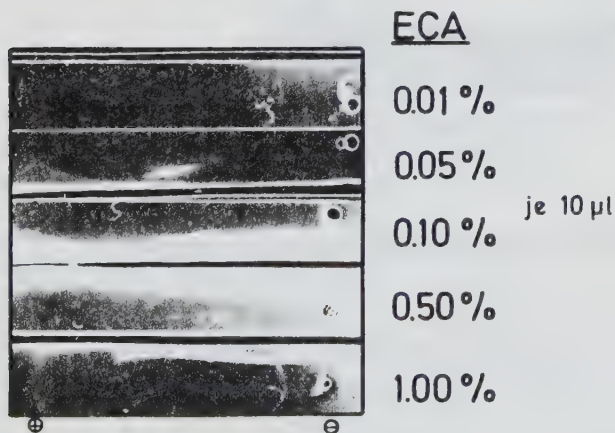
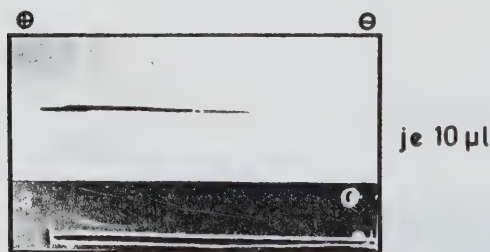


Abb. 9: ECA-Konzentrationsreihe in der Immunelektrophorese

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387)

Immunelektrophorese sollte geprüft werden, ob die Bildung des langsam-wandernden Bogens (= aggregiertes ECA) ebenfalls konzentrationsabhängig ist. Wie aus Abb. 9 zu ersehen ist, ist das "Vogelschwingen"-Muster tatsächlich eine von der eingesetzten Konzentration abhängige Eigenschaft. So zeigte dann der Einsatz des bei 37°C gewonnenen Materials in der Immunelektrophorese (Abb. 10), daß schon eine 10fache Konzentrierung



1 = 37°C-Extrakt

2 = " " , 10fach konz.

3 = ECAalk, 100fach konz.

Abb. 10: Konzentrierter 37°C-Extrakt in der Immunelektrophorese

Bei 37°C aus S. montevideo extrahiertes ECA (Tab. 3). Kontrolle: alkalisiertes ECA (100fach = 10%ige Lsg.).

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387), absorbiert mit E. coli O14 (F1327).

ausreicht, um auch bei diesem Material eine Aggregation zu erhalten. Bei dem als Kontrolle eingesetzten Alkali-behandelten ECA, das mangels Fettsäuren nicht mehr zur Micellenbildung fähig sein sollte, trat selbst bei 100facher Konzentrierung nur der schnell-wandernde

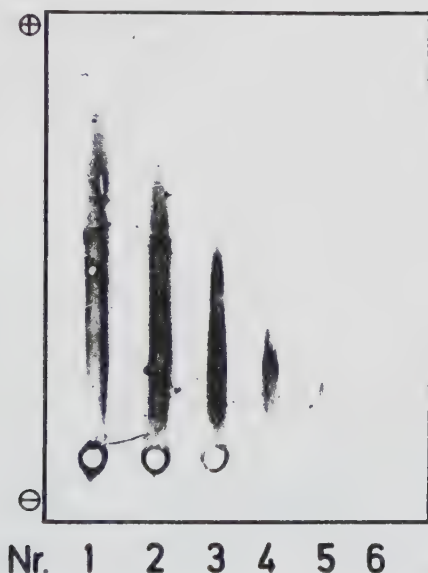


Abb. 11: Rocket-Immunelectrophorese von Hitzeüberständen aus Salmonella montevideo SH94

1.5 g lyoph. Zellen/10 ml NaCl 0.9%/1h 100°C.
Nach Abzentrifugieren der Zellen (7000xg) erneut Aufnahme in 10 ml NaCl, Kochen und Zentrifugation. Je 10 μ l der Überstände mehrerer Wiederholungen wurden in der Immunelectrophorese eingesetzt.

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387)

Bogen auf. Damit zeigte sich, daß bei der Extraktion bei 37°C zwar ECA freigesetzt wird, aber nur in geringer Menge.

Eine Extraktion bei 100°C (HU in Tabelle 3), wobei wiederholt das Zellsediment nach Zentrifugation in NaCl aufgenommen und erneut gekocht wurde (Hitzeüberstände 1-6 in Abb. 11), ergab dann auch, daß selbst bei dieser " kräftigen " Extraktion nach Wiederholung noch mehr als 50% des Ertrages des ersten Kochens isoliert werden kann.

I.4. Bestimmung der kritischen Micellenkonzentration (cmc)

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Aggregation von ECA konzentrationsabhängig ist, wurde versucht, die kritische Micellenkonzentration von ECA zu ermitteln. Die Durchführung erfolgte mit einer für Detergentien üblichen Methode (117), die darauf beruht, daß ein der Lösung zugegebener Chromophor (Phenol) in Micellen eingebaut wird und es deshalb bei Micellenbildung zu einer Abnahme der Absorption kommt (E.4.2.6.). Nach Auftragung der Absorptionsänderung gegen die Konzentration wird die kritische Micellenkonzentration als Schnittpunkt der angelegten Steigungsgeraden mit der Konzentrationsachse ermittelt. Abb. 12 zeigt die Kurve der Absorptionsänderung einer ECA-Verdünnungsreihe mit der Bestimmung der cmc.

Der ermittelte Wert von $cmc = 0.125 \text{ mg ECA/ml}$ entspricht bei einem Molekulargewicht von 2700 einer Konzentration von $0.46 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$. Dieser Wert liegt etwa um den Faktor 8 niedriger als die Konzentration, bei der in der Immunoelektrophorese erstmals das " Vogelschwingen "-Muster auftritt. Dieser Unterschied läßt sich durch die im Ver-

gleich zu einer photometrischen Bestimmung geringe Empfindlichkeit der Präzipitation erklären.

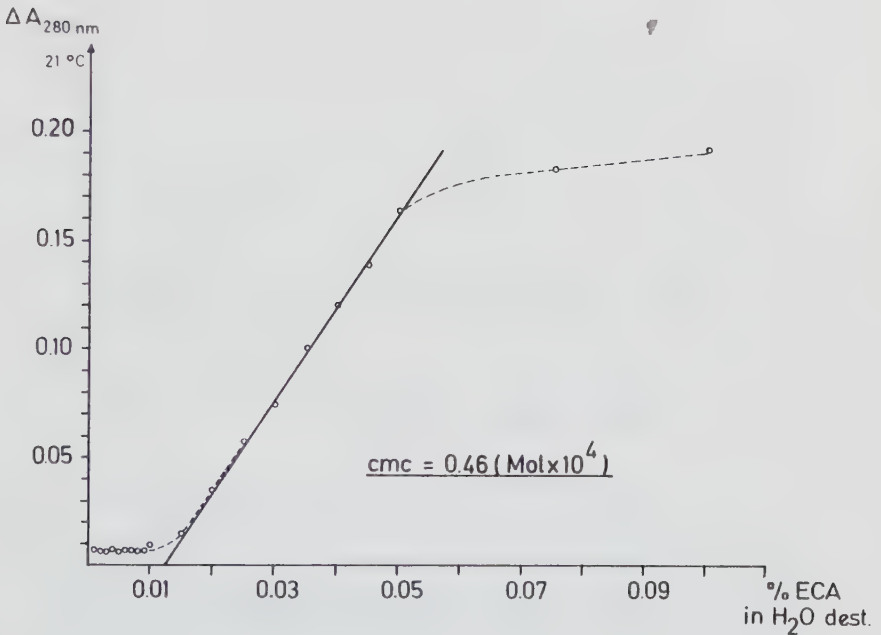


Abb. 12: Ermittlung der kritischen Micellenkonzentration von ECA (117)

$\Delta A_{280} =$ Differenz der Absorption einer 10^{-3} M wässr. Phenol-Lsg. bei 280nm vor und nach Mischen mit ECA-Lösungen der angegebenen Konzentrationen. Bei Micellenbildung von ECA (=Einbau des Phenols) wird $\Delta A \gg 0$. cmc=Schnittpunkt der Steigungsgeraden mit der Konzentrationsachse.

1.5. Auftrennung von ECA durch Gelpermeationschromatographie

Da geklärt werden konnte, daß das "Vogelschwingen"-Muster in der Immunelektrophorese auf dem Vorliegen eines Monomer/Micell-Gemisches von ECA beruht, stellte sich als nächstes die Frage, ob auch ein Anteil an deacyliertem Monomer im ECA enthalten ist. Da Micelle, Monomer und deacyliertes Monomer unterschiedliche Molekülgrößen darstellen, wurde eine Auftrennung durch Gelpermeationschromatographie auf einer Sepharose 6 B-Säule versucht (siehe E.4.1.6.). ECA wurde in einer Konzentration (5%ig) weit oberhalb der cmc aufgetragen, um das Auftreten von Micellen zu sichern. Zur Identifizierung des Elutionsbereiches von deacyliertem ECA wurde in einem zweiten Lauf alkalisiertes ECA (ECAalk) aufgetragen. Nach der Elution wurden den Fraktionen Aliquote entnommen und nach Säurehydrolyse mit dem Elson-Morgan-Test die Aminosucker-haltigen Fraktionen identifiziert.

Abb. 13 zeigt das Elutionsprofil von ECA und ECAalk aufgrund der Aminosuckerbestimmung.

Ein Vergleich des ECA-Profiles mit dem der Blue Dextran 2000-Kurve zeigt, daß ein erster Peak (Fraktionen 18-23) bereits am Ende des Ausschlußvolumens beginnt und somit ein Material sehr hoher Molekülgröße darstellt. Um sicherzustellen, daß es sich dabei tatsächlich um ECA handelt, wurde eine Fused-Rocket-Elektrophorese der Aminosucker-haltigen Fraktionen mit monospezifischem ECA-Antiserum durchgeführt. Wie aus Abb. 14 zu ersehen ist, reagieren alle vier Peaks (I-IV in Abb. 13) mit ECA-Antiserum. Die Fraktionen 50-56 reagieren nicht.

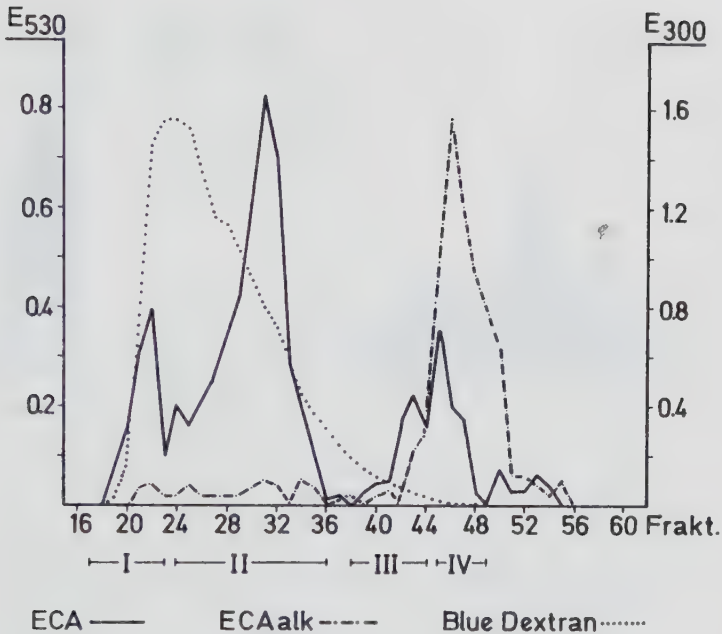


Abb. 13: Elutionsprofil von ECA und alkalisiertem ECA

ECA und alkalisiertes ECA = 5%ige wässr. Lösungen
Sephacrose 6B-Säule: Elution mit Ammoniumacetat-Puffer, 0.2M, pH 6.9. Nachweis der ECA-haltigen Fraktionen (400µl nach Hydrolyse: 4N HCl/1h 100°C) mit dem Elson-Morgan-Test für Aminosucker. Die gemessene Extinktion (530nm) wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen.

Blue Dextran = Messung bei 300nm

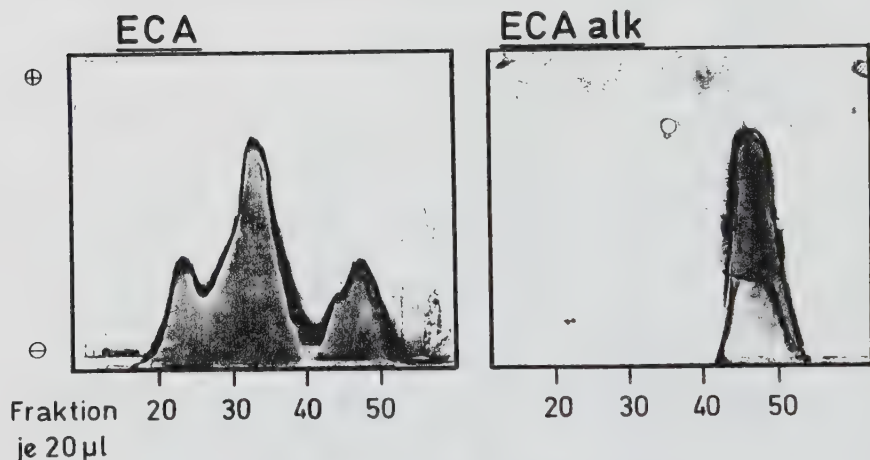


Abb. 14: Fused-Rocket-Immunelektrophorese der Säulen-
eluate

Je 20µl der Fraktionen der Sepharose 6B-Auftren-
nung von ECA und alkalisiertem ECA

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387), absor-
biert mit E. coli O14 (F1327)

Entsprechend dem Schema in Abb. 13 wurden die Fraktionen
vereinigt und das vereinigte Material im automatischen
Aminosäureanalysator, in der passiven Hämagglutination
und zur Analyse der Fettsäuren im Gaschromatographen ge-
testet. Nach Hydrolyse (4N HCl/1h 100°C) zeigt sich im
Aminosäureanalysator ein ECA-typisches Elutionsprofil
(siehe dazu: C.V.1.)

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, sind alle typischen ECA-Peaks im Elutionsprofil der Fraktionen enthalten. Vergleicht man jedoch die Verhältnisse von GlcN, Oligo A und ManNUA-Lakton, so zeigen sich erhebliche Schwankungen im GlcN-Gehalt der Fraktionen, während das Verhältnis von Oligo A zum Lakton nahezu konstant bleibt.

Aus dem Vergleich der Sepharose 6B-Elutionsprofile von ECA und alkalisiertem ECA in Abb. 13 scheint ersichtlich, daß der Peak IV der deacylierten Form von ECA entspricht. Dies wird durch das Ergebnis der passiven Hämagglutination (Tabelle 5) bestätigt: das Material von Peak IV kann Erythrozyten nicht mehr sensibilisieren, obwohl es mit ECA-Antiserum präzipitiert. Das Material von Peak III, das unmittelbar vor dem ECAalk-Peak auftritt (und teilweise mit diesem überlappt), hat hingegen noch einen -wenn auch erniedrigten- Titer.

Das Ergebnis der Fettsäureanalyse der Fraktionen ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Wie erwartet, ist im Material von Peak IV nur ein minimaler Gehalt an Fettsäuren zu entdecken. Peak II liegt mit 3.3% im üblichen Fettsäurebereich von ECA (s. Kontrolle). Peak I enthält nicht nur fast die doppelte Menge an Fettsäuren, sondern auch in erheblicher Menge die nicht in ECA enthaltene, aber für LPS typische β -Hydroxy-Fettsäure C14-OH: es scheint durch die

Peak	Fraktion	%*	nMol			Verhältnis
			GlcN	Oligo A	ManNUA-Lakton	
I	17-23	23.6	14.87	1.68	0.32	47.2:5.3:1
II	24-36	44.7	14.2	10.1	2.25	6.3:4.5:1
III	38-44	18.7	10.55	6.4	1.6	6.5:4.0:1
IV	45-49	1.4	10.1	6.9	1.5	6.6:4.5:1
ECA**	Kontrolle		34.2	34.6	8.3	4.1:4.2:1

Tabelle 4: Test der Säuleneluate im Aminosäureanalysator

200µl der vereinigten Fraktionen wurden nach Hydrolyse (4N HCl/
1h 100°C) getestet (P2-Programm)

* = Anteil der vereinigten Fraktionen der Säulenauftrennung in
% vom eingesetzten Material

** = ECA ohne Auftrennung (Kontrolle)

nMol = berechnet als nMol GlcN

Säulenauftrennung zu einer Anreicherung von LPS-Verunreinigung des ECA in dieser Fraktion gekommen zu sein.

Peak	Fraktion	Titer
I	17-23	5120
II	24-36	5120/10240
III	38-44	2560
IV	45-49	< 10
ECA*	Kontrolle	5120/10240

Tabelle 5: Passive Hämagglutination der Säuleneeluat

100µl der vereinigten Fraktionen/25µl Erythrozyten in 5ml NaCl 0.9%

* ECA ohne Auftrennung = Kontrolle

ECA-Antiserum gegen E. coli O14 (F2387)

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Tests bietet sich für die Auftrennung von ECA auf der Sepharose 6B-Säule in vier Peaks folgende Interpretationsmöglichkeit an:

Peak	Fraktion	C12	C14	C14-OH	C16	C16:1	C18	C18:1	C19	Σ %
I	17-23	0.9 %	0.5 %	2.7 %	1.4 %	0.3 %	-	0.3 %	-	6.1
II	24-36	0.2 %	0.2 %	0.4 %	1.8 %	0.4 %	-	0.3 %	-	3.3
III	38-44	0.03 %	0.06 %	-	0.1 %	-	-	-	-	0.19
IV	45-49	Spur	0.02 %	-	0.02 %	-	-	-	-	0.04
ECA*	Kontrolle	0.02 %	0.2 %	0.2 %	1.2 %	0.5 %	0.08 %	0.5 %	0.02 %	2.72

Tabelle 6: Fettsäure-Analyse der Säuleneluate

Gaschromatographischer Nachweis (Castorwax-Säule) als Fettsäuremethylester

* = ECA ohne Auftrennung (Kontrolle)

- Peak I (mit sehr hoher Molekülgröße) besteht aus Co-Micellen von ECA und LPS (C14-OH vorhanden)
- Peak II stellt das aggregierte ECA dar
- Peak III könnte das ECA-Monomer sein, da es zwar eine geringere Molekülgröße repräsentiert, aber Erythrozyten sensibilisiert. Der geringe Fettsäuregehalt der Fraktion könnte darauf zurückzuführen sein, daß in diesem Peak neben dem Monomer auch deacyliertes Monomer vorliegt (Überlappung mit dem ECAalk-Peak)
- Peak IV stellt das deacylierte ECA dar: Fettsäuren sind nur in Spuren vorhanden und Erythrozyten können nicht mehr sensibilisiert werden.

I.6. Ca⁺⁺-Gehalt von ECA

Bei der Bildung von LPS-Aggregaten wurden neben hydrophoben Kräften auch Ioneninteraktionen als Ursache der Aggregation nachgewiesen (107). ECA wurde deshalb mit Atomabsorptions-Spektrometrie auf seinen Gehalt an Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ untersucht (E.4.2.5.). Das Ergebnis der Bestimmung findet sich in Tabelle 7.

Probe	$\mu\text{g/mg Probe}$	
	Ca^{++}	Mg^{++}
ECA PLL-Fraktion*	10.7	1.2
ECA PLS-Fraktion*	11.3	0.76
LPS	4.8	4.1

Tabelle 7: Ca^{++} - und Mg^{++} -Gehalt von ECA aus Salmonella
montevideo SH94

Nachweis mit Atomabsorptions-Spektrometrie

* Bezeichnung der Fraktionen: siehe Extraktionsschema Abb.2

Der Ca^{++} -Gehalt beider ECA-Fractionen ist mehr als doppelt so hoch wie der des LPS vom gleichen Stamm, während die Mg^{++} -Werte unter dem des LPS liegen.

Wegen des hohen Ca^{++} -Gehaltes wäre auch bei der Aggregation von ECA ein Zusammenwirken hydrophober und ionischer Kräfte vorstellbar.

I.7. Zusammenfassung

ECA wurde mit verschiedenen Methoden aus lyophilisierten Zellen von Salmonella montevideo SH94 gewonnen. Das Material sensibilisierte Erythrozyten und präzipitierte mit monospezifischem ECA-Antiserum, zeigte jedoch nicht das charakteristische "Vogelschwingen"-Muster in der Immunelektrophorese. Durch Behandlung von ECA mit Detergentien konnte gezeigt werden, daß das "Vogelschwingen"-Muster auf dem Vorliegen eines Gemisches aus Monomeren und Micellen beruht. Das Auftreten der Micellen erwies sich als konzentrationsabhängige Eigenschaft und der Wert für die kritische Micellenkonzentration (cmc) wurde bestimmt. Durch Auftrennung von ECA mit Gelpermeationschromatographie konnte gezeigt werden, daß im PW/PCP-extrahierten ECA auch deacyliertes ECA enthalten ist. ECA hat einen hohen Gehalt an Ca^{++} .

II. Untersuchungen zum Fettsäureteil von ECA

Wie sich im Abschnitt I. gezeigt hat, ist die Oberflächenaktivität von ECA nicht von der Bildung von Micellen abhängig; alle getesteten Überstände sensibilisieren Erythrozyten. Dies ist jedoch nicht so, wenn durch alkalische Hydrolyse die Fettsäuren von ECA abgespalten werden. Dadurch wird deutlich, daß dem Fettsäureteil von ECA trotz seines geringen Anteils am Gesamtmaterial für die Eigenschaften von ECA eine wesentliche Bedeutung zukommt. Im folgenden Abschnitt sollte deshalb der Fettsäureteil von ECA näher untersucht werden.

II.1. Fettsäurezusammensetzung von ECA

Die Fettsäurezusammensetzung von PW/PCP-extrahiertem ECA aus S. montevidео SH94 (Glattkeim), E. coli K-12; CE1162 (nicht-immunogene R-Form) und E. coli O8⁻:K27⁻; F470 (immunogene R-Form) wurde durch kombinierte GC/MS-Analyse untersucht. In Abb. 16 sind die Massenfragmentogramme der Masse m/e 74 der Fettsäuremethylester abgebildet. Diese Masse ist ein für Fettsäuremethylester typisches Fragment und entsteht durch die sogenannte McLafferty-Umlagerung (Abb. 15).

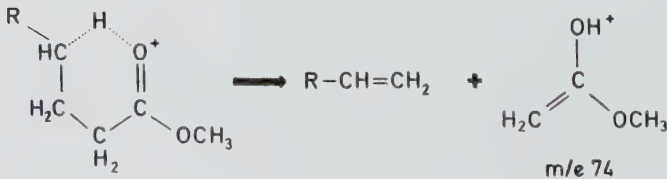
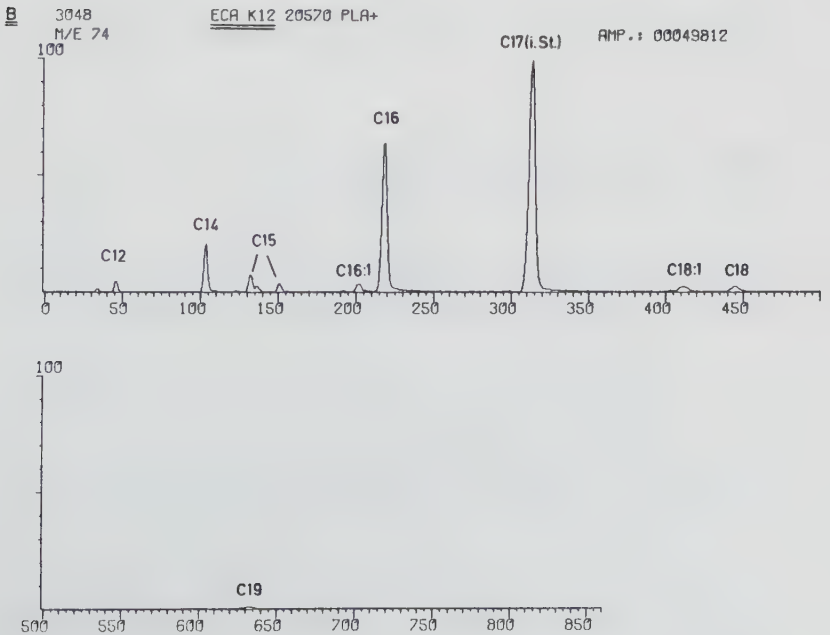
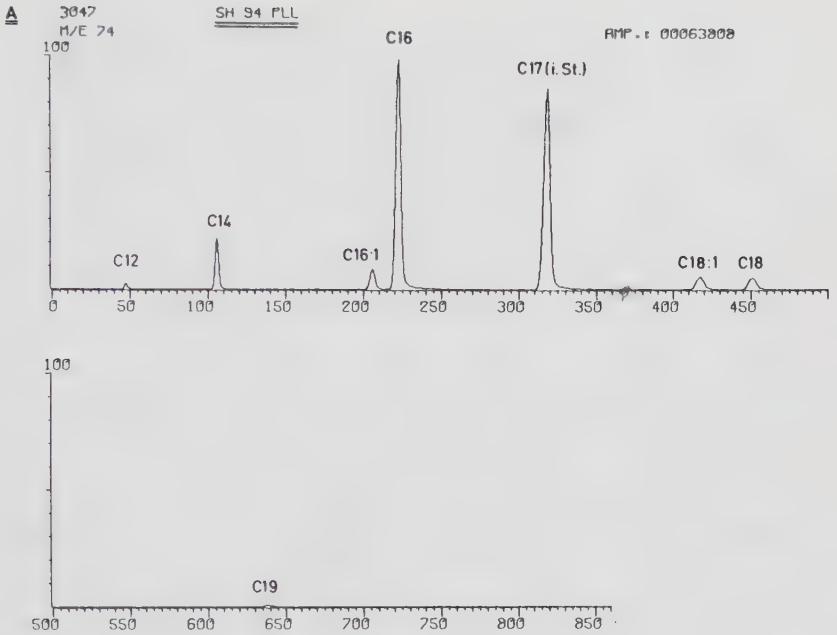


Abb. 15: McLafferty-Umlagerung von Fettsäuremethylestern



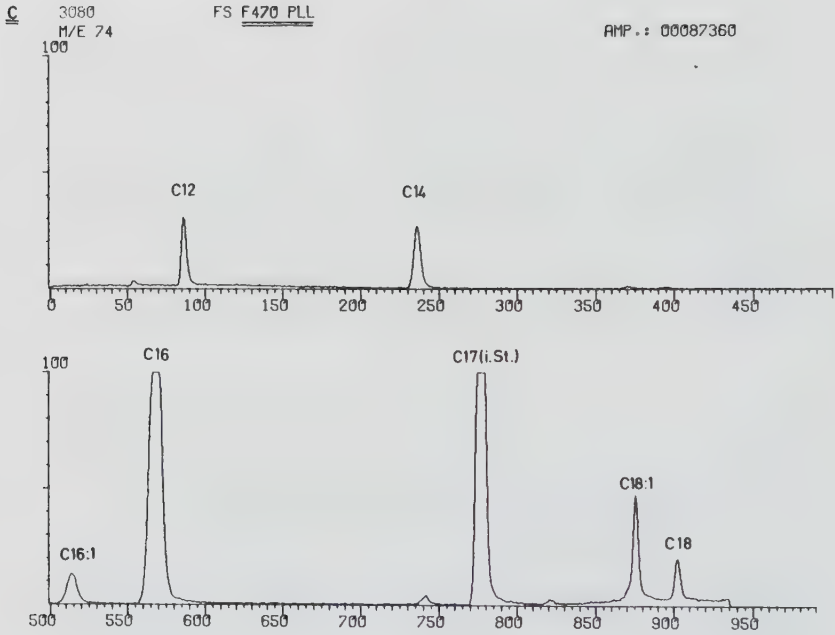


Abb. 16: Massenchromatographie der Masse m/e 74 der
Fettsäuremethylester von ECA

A = S. montevideo SH94 (Glattkeim)

B = E. coli K-12 CE1162 (nicht-immunogene
R-Form)

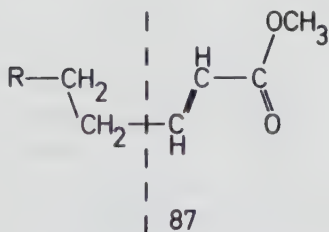
C = E. coli O8⁻:K27⁻ F470 (immunogene R-Form)

GC/MS: interner Standard = C17:0

cpTM-SIL5-Säule; 70 eV; 195°C iso-
therm; ab Spektrum 270: 10°C/min

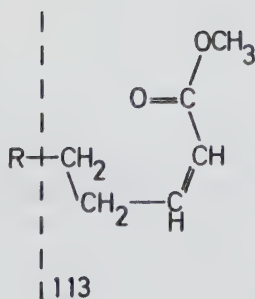
Wie aus der Massenchromatographie zu ersehen ist, ist die Fettsäurekomposition der drei ECA-Proben nahezu identisch. Neben den gesättigten Fettsäuren treten auch zwei ungesättigte (C16:1 und C18:1) auf. Die Position der Doppelbindungen von Fettsäuren ist anhand der Massenspektren aber mit Ausnahme von Δ^2 nicht direkt lokalisierbar. Bei Δ^2 -Fettsäuren treten die Fragmente 113 oder 87 als Basispeak der cis- und trans-Form auf (Abb. 17).

m/e 87



= trans

m/e 113



= cis

Abb. 17: Fragmente 87 und 113 von Δ^2 -ungesättigten Fettsäuren (124)

Die Fragmente 87 und 113 treten in den Massenspektren von C16:1 und C18:1 von ECA nicht als Basispeak auf (Abb. 18). Zudem zeigen C16:1 und C18:1 kleinere Retentionszeiten bei der gaschromatographischen Auftrennung als die entsprechenden gesättigten C16:0 und C18:0; unter den hier verwendeten Bedingungen eluieren die

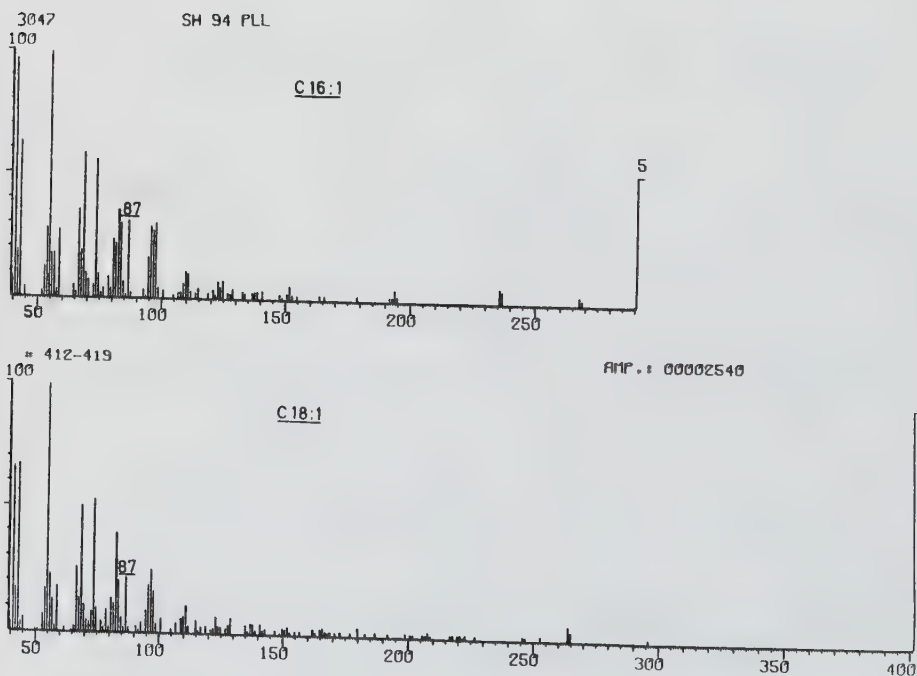


Abb. 18: Massenspektren von C16:1 und C18:1 aus Salmonella montevideo SH94-ECA

GC/MS: cpTM-SIL®-Säule; 70 eV; 195°C isotherm, ab
Spektrum 270: 10°C/min

Δ^2 -ungesättigten Fettsäuren aber nach den entsprechenden gesättigten von der Säule. Die Doppelbindung von C16:1 und C18:1 ist also nicht in der Δ^2 -Position. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Untersuchung von D. Männel (78), die für die C16:1 eine Δ^2 -Position der Doppelbindung bestimmt hatte. An welcher Stelle sich die Doppelbindung befindet, kann -wie schon erwähnt- anhand der vorliegenden Spektren nicht bestimmt werden. Durch geeignete Derivatisierung kann diese Frage jedoch geklärt werden.

Wie in Abschnitt C.I.5. gezeigt wurde, enthält unser ECA-Präparat auch einen Anteil an deacyliertem Monomer. Für die Lipoteichonsäure aus Streptococcus faecalis konnte die Überführung der acylierten in die deacylierte Form durch eine membrangebundene Deacylase nachgewiesen werden (60). In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß Einwirkung von Phospholipase A₂ das Verhalten von ECA verändert. Da Phospholipase A als Bestandteil der äußeren Membran von Enterobacteriaceae nachgewiesen wurde (104; 106; 127), wäre eine Entstehung der deacylierten Monomere durch Einwirkung membrangebundener Phospholipase während der Aufarbeitung der Zellen vorstellbar. Aus diesem Grunde wurde in die Bestimmung des Fettsäuregehaltes von ECA (Tab. 8) zusätzlich eine Phospholipase-negative Mutante von E. coli K-12 CE1162 hinzugezogen (pldA⁻-Mutante: E. coli K-12 CE1163). Wenn die Deacylierung durch Phospholipase erfolgt, sollte dieser Stamm ECA mit einem höheren Fettsäuregehalt besitzen.

ECA aus	%										Σ %
	C12	C14	C15	C16	C16:1	C18	C18:1	C19	C14-OH		
<u>S. montevideo</u>	0.02	0.2	-	1.2	0.5	0.08	0.5	0.02	0.2	2.72	
<u>E. coli</u> K-12	0.04	0.2	Spur	0.9	0.3	Spur	0.3	0.2	0.2	2.14	
<u>E. coli</u> K-12 (pldA ⁻)	0.03	0.1	Spur	0.8	0.2	Spur	0.1	0.2	0.2	1.63	
<u>E. coli</u> F470	0.65	0.64	-	1.7	0.92	Spur	0.88	-	1.74	6.53	

Tabelle 8: Fettsäuregehalt von ECA

Gaschromatographischer Nachweis als Fettsäuremethylester
(Castorwax- Säule)

ECA aus dem immunogenen Stamm E. coli F470 besitzt mehr als doppelt soviel Fettsäuren wie die nicht-immunogenen Stämme. Ein beachtlicher Anteil des Fettsäuregehaltes von F470-ECA besteht aus C14-OH, einer LPS-typischen Fettsäure: möglicherweise war die Trennung von LPS oder LPS-gebundenem ECA von LPS-freiem ECA nicht vollständig, so daß der hohe Fettsäuregehalt teilweise auf LPS-Fettsäuren beruhte.

Die pldA^- -Mutante von E. coli K-12 besitzt einen geringeren Fettsäuregehalt als der zugehörige pldA^+ -Stamm: die Entstehung der deacylierten Monomere durch Einwirkung von Phospholipase während der Zellaufarbeitung erscheint damit unwahrscheinlich.

II.2. Lipid-Anker von ECA

Einwirkung von Phospholipase A_2 verändert das Verhalten von ECA. Dabei wird -wie bei der alkalischen Hydrolyse- die Affinität von ECA zu Zelloberflächen zerstört (84). Dies konnte als Hinweis für einen separaten Lipidteil im ECA-Molekül gesehen werden. Dieser Lipidteil sollte isoliert und seine Struktur ermittelt werden.

II.2.1. Isolierung des Lipidteils

Wegen der Einwirkung der Phospholipase A_2 auf ECA konnte von einer Bindung des Lipidteils an das Zuckerpolymer über eine Phosphodiester-Brücke ausgegangen werden. Um den Lipidteil vom Rest des Moleküls zu trennen, wurde deshalb eine Spaltung mit Flußsäure bei 0°C vorgenommen (E.4.9.).

Aus dem Reaktionsansatz wurden die Lipide durch Extraktion mit Chloroform/Methanol/Wasser (E.4.10.) gewonnen und nach Trocknung für die weitere Untersuchung verwendet.

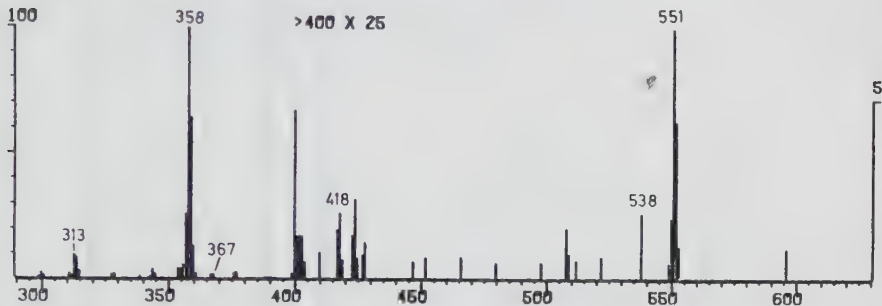
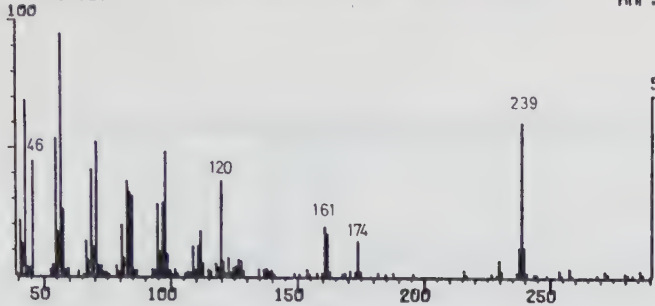
II.2.2. Identifizierung des Lipidteils durch Massenspektrometrie

Von den Fettsäureanalysen war bekannt, daß Palmitinsäure die Hauptfettsäure des ECA darstellt. Aus diesem Grund wurde 1.2.-Dipalmitin als Standardsubstanz für die massenspektrometrische Untersuchung des Lipidteils ausgewählt. Da beim Erhitzen von Diglyceriden die in 2-Stellung befindliche Fettsäure teilweise in 3-Stellung überwechselt -also ein 1.2/1.3-Diglyceridgemisch gebildet wird-, wurde die freie 3-Stellung zuvor durch Deuteroacetylierung blockiert (E.4.11.). In Abb. 19 sind die Massenspektren des deuteroacetylierten Standards (a) und des nicht-deuteroacetylierten isolierten Lipidteils von SH94-ECA zu sehen (b).

Ein Vergleich der beiden Spektren (unter Berücksichtigung der Deuteroacetylierung des Standards) läßt große Ähnlichkeit des ECA-Lipidteils mit dem Dipalmitin erkennen. Doch sind alle M-[...] -Fragmente (siehe Tabelle 9) um die Masse 2 erniedrigt und die R-Fragmente werden von ebenfalls um die Masse 2 abweichenden Fragmenten begleitet. Daraus folgt, daß

- a) der Lipidteil von ECA ebenfalls ein Diglycerid ist und
- b) neben einer gesättigten C16-Fettsäure eine ungesättigte C16:1 vorliegen muß.

a 2772/7 HMK-DIPALMITIN-STAND.-DEUTERIO-ACETYL..1/10
 90-120 RMF.: 00040556



b 2763/2 HMK 324 HF ORG ECA -ANCHOR 5/50
 60-100 RMF.: 00093184

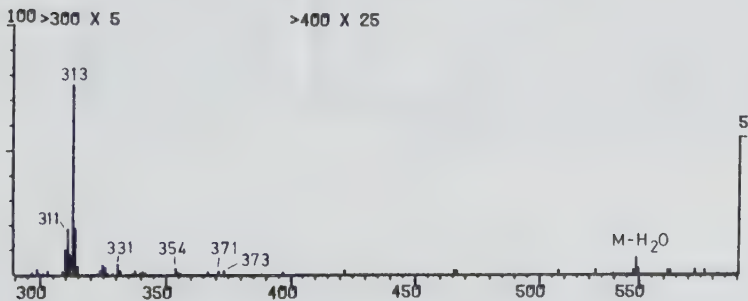
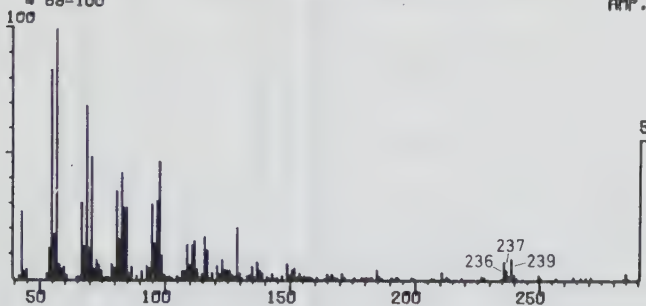


Abb. 19: Massenspektren von *S. montevidео* ECA-Lipidteil (b) und deuterioacetyliertem 1.2.-Dipalmitin (a)

MS: 70eV/Festkörpereinlaß/langsames Heizen bis 300°C

Fragment		Voraussetzung
RCOOH		
RCOO		
RCO		
RCO - 1		ungesättigt
RCO + 74	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R} \end{array} $	Position 1 und 3
RCO + 115	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_2)- \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R} \end{array} $	Position 1 und 3
RCO + 128	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H}-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \end{array} $	
RCOOCH ₂		
McLafferty	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R} \end{array} + \text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2 $	
M - (RCOOH)		
M - (RCOO)		
M - (RCO)		
M - (RCO - 1)		ungesättigt
M - (RCO + 115)		Position 1+3
M - (RCO + 74)		Position 1+3
M - (RCO + 128)		
M - (RCOOCH ₂)		Position 1+3

() = nicht im Spektrum enthalten

Tabelle 9: Fragmente bei der Spaltung von Glyceriden
(105)

+PL A₂ = Lipidteil von Phospholipase A₂-behandeltem ECA

C²H₃- = Fragmente der Deuteroacetyl-Gruppe

m/e									
DIPALMITIN		ECA - LIPIDTEIL					+ PLA ₂		
deut.acetyl.		deut.acetyl.					deut.acetyl.		
C 16	C ² H ₃ -	C 16	C16:1	C 16	C16:1	C ² H ₃ -	C 16	C ² H ₃ -	
(256)	(63)	256	(254)	(256)	254	63	(256)	63	
255	(62)	(255)	(253)	(255)	253	62	255	(62)	
239	46	239	237	239	237	46	239	46	
-	-	-	236	-	236	-	-	-	
313	120	313	311	313	311	120	313	120	
354	161	354	(352)	354	(352)	161	354	161	
367	174	367	(365)	367	(365)	174	(367)	174	
269	76	269	267	269	267	76	269	76	
418	-	371	373	416	418	-	240	-	
358	551	311	313	356	358	549	164	357	
359	552	312	314	357	359	550	165	358	
(375)	(568)	(328)	(330)	(373)	(375)	(566)	(181)	374	
-	-	-	331	-	376	-	-	-	
260	(453)	213	215	(258)	(260)	451	66	(259)	
301	(494)	(254)	256	(299)	(301)	492	107	300	
(247)	(440)	(200)	(202)	245	247	438	(53)	(246)	
345	538	298	(300)	(343)	345	(536)	151	344	

Eine Aussage über die Positionen der Fettsäuren im Glycerid war jedoch nicht möglich: zwar traten die Fragmente 120 (RCO+74) und 161 (RCO+115) des Deuteroacetyls auf, woraus auf ein 1.2.-Diglycerid geschlossen werden kann. Doch die für die Positionsbestimmung wesentlichen Fragmente (siehe Tabelle 9) der beiden Fettsäuren traten nicht oder nur in Spuren auf.

II.2.3. Bestimmung der Positionen der Fettsäuren im Diglycerid

Aus der spezifischen Abspaltung von Fettsäuren aus der C2-Position durch Phospholipase A₂ ergibt sich die Möglichkeit, die Stellung der Fettsäuren im ECA-Lipidteil zu bestimmen: ECA wurde mit Phospholipase A₂ inkubiert (ECA-PL A₂) und der Lipidteil des so behandelten Materials wie oben beschrieben durch Flußsäure abgespalten. Nach Deuteroacetylierung wurde das Material massenspektrometrisch untersucht. In einem solchen Spektrum sollten die Fragmente der Fettsäure in der C2-Stellung fehlen: tatsächlich fehlen die Fragmente der Palmitoleinsäure (m/e 237; 236; 311), während die Fragmente der Palmitinsäure auftreten (Abb. 21; siehe dazu Tabelle 9). Die gesättigte C16:0 nimmt also die C1-Stellung im Diglycerid ein.

Der Lipidteil von ECA konnte somit als Phosphoglycerid mit

R₁ = Palmitinsäure

und

R₂ = Palmitoleinsäure

identifiziert werden.

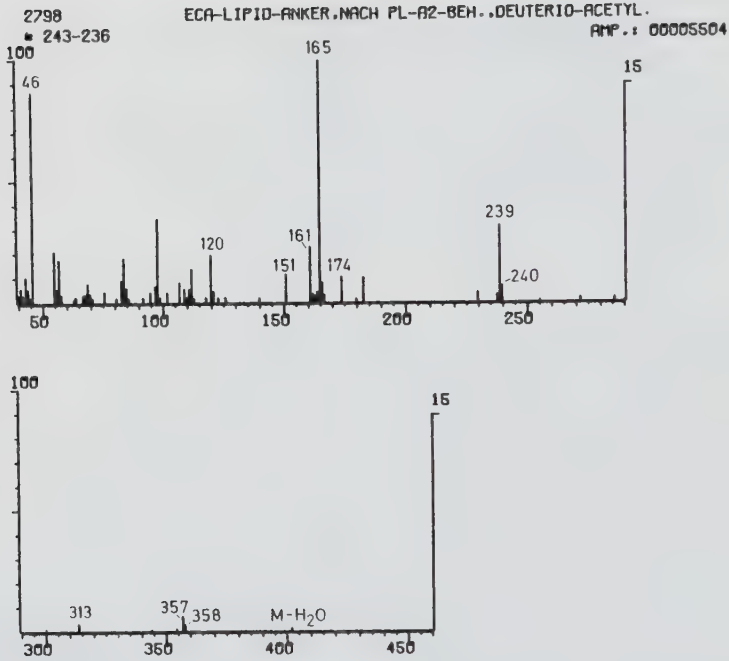


Abb. 21: Massenspektrum des Lipidteils von Phospholipase A₂-behandeltem ECA nach Deuteroacetylierung

MS: 70 eV; Festkörpereinlaß; langsames Heizen bis 300°C

II.2.4. Bestimmung von Phospholipid

Um sicherzustellen, daß die als Lipidanker von ECA beschriebene Struktur nicht auf eine bei der Isolierung von ECA entstandene Verunreinigung mit Zellwand-Phospholipiden zurückzuführen ist, wurde mit ECA eine Phospho-

lipidbestimmung durchgeführt (E.4.3.4.). Nach Erstellung einer Eichkurve mit DL-3-Lecithin als Standard, wurde ECA getestet. Aufgrund der Extinktion konnte aus der Eichkurve ein Phospholipidgehalt in ECA von weniger als 1% ermittelt werden. Dieses Ergebnis in Verbindung mit der Tatsache, daß Phospholipase A₂-Behandlung zu einer Veränderung der Eigenschaften von ECA führt, schließt eine Verunreinigung aus.

II.2.5. Lipidteil von ECA aus Escherichia coli K-12 und O8⁻:K27⁻ (F470)

Um sicherzustellen, daß das als Lipidteil von S. montevideo identifizierte Phosphoglycerid nicht auf diesen Stamm beschränkt, sondern eine allgemein dem ECA zugehörige Struktur ist, wurden zwei weitere Stämme (E. coli K-12 und F470) auf ihren Lipidteil untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob auch das LPS-freie ECA des immunogenen Stammes F470 einen derartigen Lipidteil besitzt: wie in der Einleitung bereits beschrieben, verhält sich LPS-freies ECA von immunogenen Stämmen hinsichtlich seiner Immunogenität anders als ECA von nicht-immunogenen Stämmen. Diese Differenzen im Verhalten könnten möglicherweise auf Unterschiede im Lipidteil zurückzuführen sein. Das ECA beider Stämme wurde (wie für Salmonella beschrieben) einer Flußsäure-Spaltung unterzogen, der Lipidteil isoliert und nach Deuteroacetylierung im Massenspektrometer untersucht. In den Spektren beider Stämme finden sich die wesentlichen Fragmente des für Salmonella beschriebenen Phosphoglycerides.

Damit konnte gezeigt werden, daß der beschriebene Lipid-Teil Bestandteil von ECA ist und nicht eine Besonderheit des Salmonella-Stammes SH94. Da auch der immunogene Stamm F470 das Phosphoglycerid enthält, ist der Lipidteil nicht für den Unterschied der Immunogenität von ECA (Äthanol-löslich) aus immunogenen und nicht-immunogenen Stämmen verantwortlich.

II.2.6. Bindung des Lipidteils an das Aminosuckerpolymer

Nachdem der Lipidteil identifiziert werden konnte, war die Bindungsstelle des Lipidteils an das Aminosuckerpolymer zu ermitteln. Die Bestimmung von Bindungspositionen in Polysacchariden ist durch eine Methylierungsanalyse möglich. Vor der hier durchgeführten Methylierung wurde ManNAcUA nicht zu ManNAc reduziert; deshalb werden in der GC/MS-Analyse nur die Alditolacetate von GlcNAc auftreten, da die Alditolacetate von Uronsäuren nicht flüchtig genug sind.

ECA wurde nach Hakomori (35) methyliert (E.4.8.1.) und nach Abspaltung des Lipidteils mit Flußsäure (E.4.9.) mit deuteriertem Methyljodid erneut methyliert; da die Aminosucker bereits methyliert waren, wird nur das bei der Abspaltung des Lipidteils freigewordene C-Atom deuteromethyliert. Nach Hydrolyse und Reduktion wurde das Material acetyliert (E.4.8.2.-4.).

Das Produkt dieser Behandlung sollte an allen C-Atomen mit vormals freien Hydroxylgruppen sowie an der N-Acetylaminogruppe methyliert sein und an allen C-Atomen, die

an der Bindung in der Zuckerkette beteiligt waren, eine O-Acetyl-Gruppe tragen. Zusätzlich sollte der an der Bindung zum Lipidteil beteiligte Zucker am Bindungs-C-Atom durch eine Deuteromethylgruppe markiert sein.

In Abb. 22 findet sich das Massenchromatogramm der Masse m/e 158 (vergleiche Formelschema Abb. 23): zwei Peaks der gaschromatographischen Auftrennung enthalten dieses Fragment. Die Massenspektren dieser Peaks sind in Abb. 23 mit den entsprechenden Fragmentierungsschemata abgebildet.

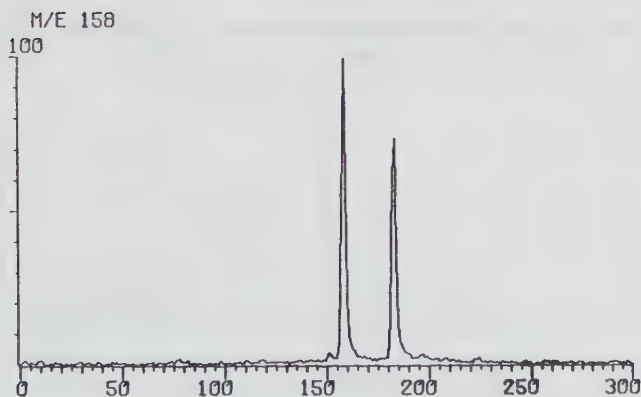
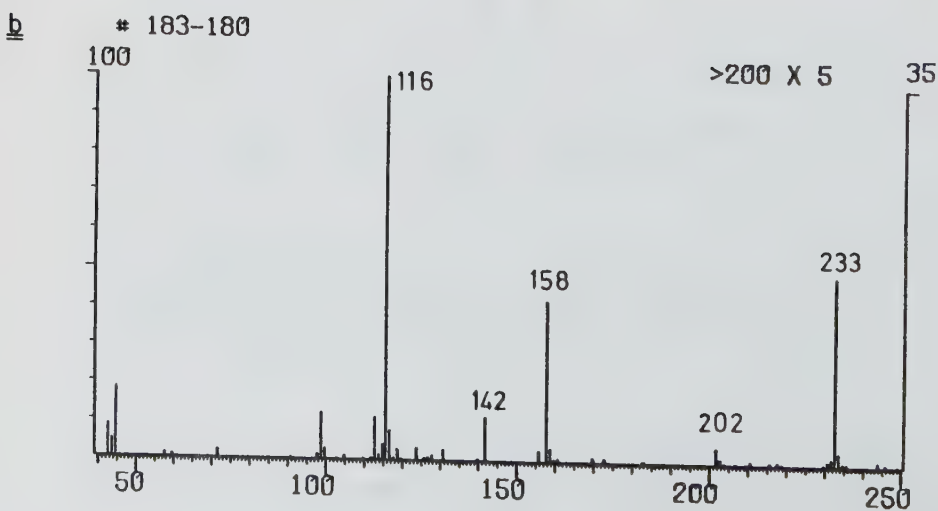
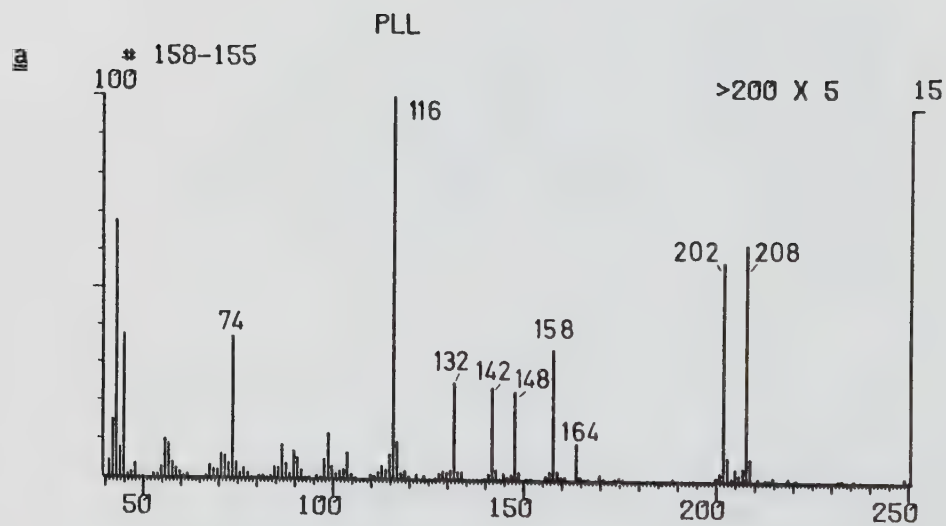


Abb. 22: Massenchromatographie der Masse m/e 158 des permethylierten ECA nach Abspaltung des Lipidankers

GC/MS: cpTM-SIL5-Säule/70 eV/205°C-250°C: 6°C/min



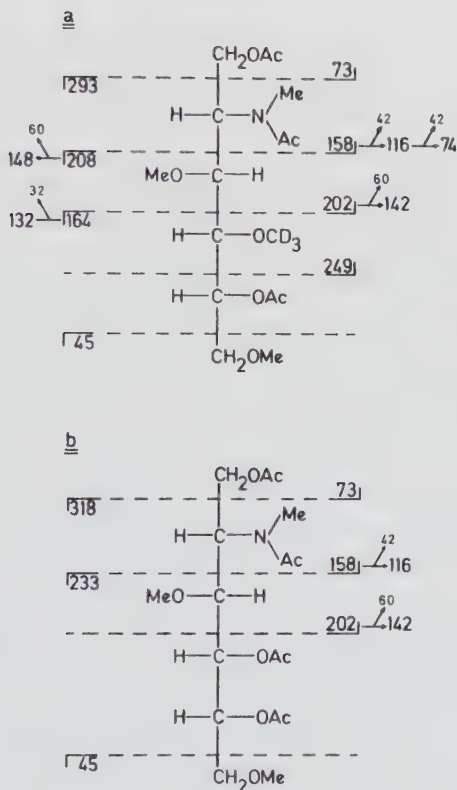


Abb. 23: Massenspektren von Peak 158-155 (a) und 183-180 (b) mit Fragmentierungen

- a) 3.6-di-O-methyl-4-O-deuteromethyl-2-deoxy-2-N-methylacetamido-1.5-di-O-acetyl-glucitol
- b) 3.6-di-O-methyl-2-deoxy-2-N-methylacetamido-1.4.5-tri-O-acetyl-glucitol

CD₃ = Deuteromethylgruppe

GC/MS: wie bei Abb. 22

Peak 180-183 stellt das nicht an der Bindung des Lipidteils beteiligte 3.6-di-O-methyl-2-deoxy-2-N-methylacetamido-1.4.5-tri-O-acetyl-glucitol dar. Peak 155-158 konnte anhand der Fragmente als 3.6-di-O-methyl-4-O-deuteromethyl-2-deoxy-2-N-methylacetamido-1.5-di-O-acetyl-glucitol identifiziert werden (Abb. 23). Diese Substanz könnte den Bindungszucker zum Lipidteil darstellen; da sich die Deuteromarkierung in der C4-Position befindet, müßte der Lipidteil von ECA an das C4 von GlcNAc gebunden sein. Damit wäre ebenfalls bestätigt, daß der Lipidteil an einem endständigen Zucker des Polymers gebunden ist, da die C4-Stellung innerhalb der Kette durch die 1.4-glykosidische Bindung besetzt ist (78; siehe auch Peak 180-183). Gegen die Annahme, daß dieser Zucker den Bindungszucker darstellt, spricht aber das Verhältnis der Peakflächen (GC) der beiden identifizierten Zucker (3.6-methyl und 3.4.6-methyl) von etwa 1:1; danach müßte auf jedes kettenständige GlcNAc ein Bindungszucker und damit auch ein Lipidteil kommen. Dies ist aber aufgrund des Fettsäuregehaltes von ECA (ca. 3%) nicht möglich. Lindberg et al. (67) beschrieben eine Methode zur Untersuchung Uronsäurehaltiger Polysaccharide, die darauf beruht, daß ein nach Hakomori methyliertes Uronsäure-haltiges Polysaccharid bei Behandlung mit Alkali einer β -Eliminierung unterliegt. Dabei wird der Substituent an C4 unter Einführung einer Doppelbindung freigesetzt und als Folge davon durch Labilisierung der Bindung an C1 auch der Substituent an C1. Bei der hier durchgeführten zweiten Methylierung mit CD₃I treten ebenfalls alkalische Bedingungen auf, so daß die Voraussetzungen für eine β -Elimination gegeben sind. Wird als Folge davon die 1.4-Bindung der Kette gelöst, würde die C4-Position durch die Deute-

romethylierung markiert; das Auftreten des 3.4.6-methylierten Zuckers und die Markierung an C4 könnten also auch Folge einer partiell aufgetretenen β -Eliminierung sein.

Um dies zu überprüfen, wurde ECA nach Abspaltung des Lipidteils durch Flußsäure nur einfach methyliert und mit GC/MS untersucht. Eine Markierung der Lipidteil-Bindungsstelle ist dabei nicht möglich. Da dieses Material nur einmal methyliert wurde, waren die Voraussetzungen für eine β -Eliminierung nicht gegeben.

Auch in diesem Material trat der 3.4.6-methylierte Zucker auf, der in ECA ohne Flußsäurebehandlung nicht zu finden ist. Das Verhältnis von 3.4.6-methyliertem zu 3.6-methyliertem Glucosaminitol war aber 1:3, was -unter Berücksichtigung des Fehlens von ManNAcUA unter diesen Bedingungen- einen realistischen Wert darstellt. Das 3.4.6-methylierte Glucosaminitol stellt also den Bindungszucker zum Lipidteil dar, die markierte C4-Position die Bindungsstelle. Doch ist die nach Doppel-methylierung erhaltene große Menge an diesem Material vermutlich ein Gemisch aus Bindungszucker und als Folge von β -Eliminierung in C4 markiertem kettenständigem Zucker.

II.2.7. Fettsäuregehalt von ECA nach Abspaltung des Lipidteils

Die Fettsäurezusammensetzung von ECA aus S. monteideo (Tab. 7) zeigt ein Verhältnis von C16:0 zu C16:1 von 2.4:1; beide machen zusammen nur etwa 60% des Fettsäuregehaltes von ECA aus. Aufgrund der ermittelten Struktur des Lipidteils wäre aber ein Verhältnis der beiden Fettsäuren von 1:1 zu erwarten. Um den Verbleib der restli-

chen C16:0 sowie der übrigen Fettsäuren zu klären, wurde die bei der Lipidextraktion nach Flußsäure erhaltene wässrige Phase auf ihren restlichen Fettsäuregehalt geprüft. Wie Tab. 10 zu entnehmen ist, enthält ECA nach Abspaltung des Lipidankers nur noch weniger als 0.1% Fettsäuren. Der Verbleib der restlichen Fettsäuren konnte nicht geklärt werden.

	ECA-Aminozuckerteil
C12	0.003 %
C14	0.01 %
C16	0.02 %
C16:1	0.003 %
C18	0.002 %
C18:1	0.007 %
Σ	0.072 %

Tabelle 10: Fettsäuregehalt des Aminozuckerteils von
ECA aus Salmonella montevideo

ECA: wässrige Phase der Lipidextraktion
nach Abspaltung des Lipidankers durch
Flußsäure

Gaschromatographischer Nachweis als Fettsäure-
methylester (Castorwax-Säule)

Möglicherweise ist die Besetzung der C2-Position im Phosphoglycerid mit Fettsäuren variabel und es liegen neben

dem identifizierten Lipidteil mit C16:0/C16:1 zusätzlich solche mit C16:0/C16:0, C16:0/C18:0 und C16:0/C18:1 vor. So finden sich im Massenspektrum des Lipidteils von ECA (Abb. 19):

- mit geringerer Intensität auch die RCOOH-, RCO- und RCO+74-Peaks von C18:0 (m/e 284; 267; 341) und C18:1 (m/e 282; 265; 339) sowie RCO-1 von C18:1 (m/e 264)
- M-[CD₃COOH] von C16:0/C16:0 (m/e 551) und C16:0/C18:1 (m/e 577)

Zudem sind die meisten R-Peaks von C16:0 größer als die von C16:1.

Ob die Besetzung der C2-Position im ECA-Lipidteil tatsächlich variabel ist, soll noch durch Identifizierung der durch Phospholipase A₂ freigesetzten Fettsäuren geklärt werden.

II.3. Modifizierung des Lipidteils

Im folgenden Teil sollte untersucht werden, welche Auswirkungen verschiedene Modifizierungen des Lipidteils auf die Eigenschaften von ECA haben.

II.3.1. Chemische Modifizierung

Außer mit Alkali wurde ECA auch mit Trichloressigsäure (ECA-TCA) behandelt. TCA wurde deshalb gewählt, weil zur Extraktion von Lipoteichonsäuren vielfach TCA

verwendet wurde und bei dieser Art der Extraktion nur das deacylierte Monomer der Lipoteichonsäuren erhalten wird (168); TCA verändert also den Lipidteil des Moleküls. Eine 0.1%ige ECA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen TCA (20% in dest. H_2O) 24 Stunden bei 4°C gerührt. Die TCA wurde aus dem Gemisch mit Äther so lange ausgeschüttelt, bis der pH konstant blieb. Die TCA-freie Lösung wurde danach lyophilisiert und 0.1%ig in dest. H_2O gelöst. (ECA-TCA).

Eine Fettsäureanalyse des TCA-behandelten ECA ergab einen Fettsäuregehalt von nur 0.04%: durch TCA wurde also der Fettsäuregehalt von ECA herabgesetzt. Dies geschah vermutlich durch Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen Zucker- und Lipidteil, da sich der O-Acetyl-Gehalt durch TCA-Behandlung kaum veränderte (von 1.3% beim unbehandelten auf 1.0%).

II.3.2. Enzymatische Modifizierung

Die Modifizierung von ECA durch Einwirkung von Phospholipase A_2 und Lipase aus Candida albicans (E.5.1. und E.5.2.) sollte geprüft werden (ECA-PL A_2 und ECA-Lip). Die Lipase-Reaktion verlief außerordentlich langsam : nach eintägiger Inkubation war noch keinerlei Veränderung (PHA) bemerkbar. Auch das für die Tests eingesetzte Material (7 Tage Inkubation) war noch nicht vollständig umgesetzt.

II.3.3. Verhalten von ECA nach chemischer und enzymatischer Modifizierung

Die nach II.3.1. und II.3.2. behandelten Proben wurden in der Immunelektrophorese (Abb. 24) und in der Crossed Immunelektrophorese (Abb. 25) auf Veränderungen im Präzipitationsmuster getestet.

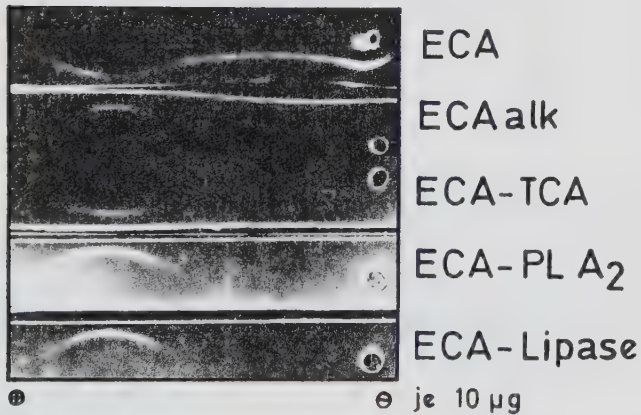


Abb. 24: Immunelektrophorese der modifizierten ECA-Proben

ECA = aus Salmonella montevideo SH94
ECAalk = Alkali-behandeltes ECA
ECA-TCA = TCA-behandeltes ECA
ECA-PL A₂ = Phospholipase A₂-behandeltes ECA
ECA-Lipase = Lipase-behandeltes ECA
ECA-Antiserum gegen E.coli 014 (F2387)

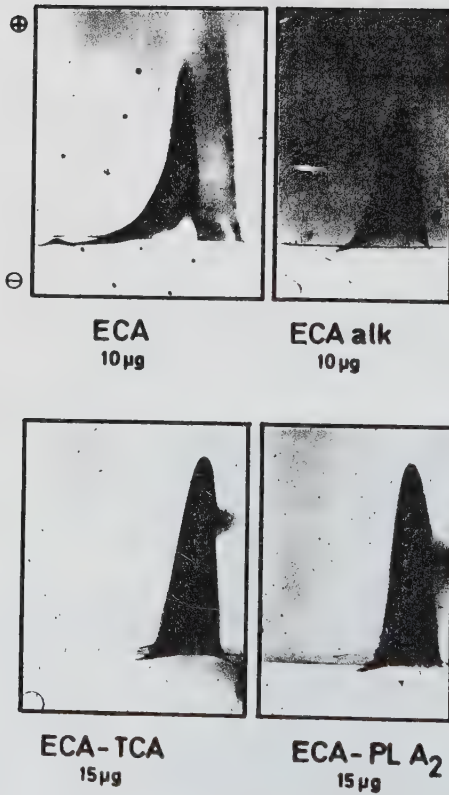


Abb.25: Crossed-Immunelektrophorese der modifizierten ECA-Proben

ECA = aus Salmonella montevideo SH94
 ECAalk = Alkali-behandeltes ECA
 ECA-TCA = TCA-behandeltes ECA
 ECA-PL A₂ = Phospholipase A₂-behandeltes ECA
 ECA-Antiserum gegen E. coli 014 (F2387)

Alle behandelten Proben reagieren also noch mit ECA-Antiserum, zeigen aber nicht mehr das "Vogelschwingen"-Muster: nach Fettsäure-Abspaltung ist eine Micellenbildung nicht mehr möglich.

Der Einsatz der Proben in der passiven Hämagglutination (Tabelle 11) zeigte, daß mit dem Verlust der Fettsäuren auch ein Verlust der Fähigkeit zur Sensibilisierung von Erythrozyten einhergeht. Die Lipase-behandelte Probe (ECA-Lip) besitzt zwar noch einen Titer, doch ist dieser gegenüber der Kontrolle weit herabgesunken und läßt sich vermutlich auf eine noch nicht vollständige Abspaltung der Fettsäuren zurückführen.

Wie die Ergebnisse der Präzipitation zeigen, ist der Lipidteil von ECA für die Antigenität des Moleküls ohne wesentliche Bedeutung: die Fettsäure-reduzierten oder -freien Moleküle reagieren ohne Ausnahme mit dem ECA-Antiserum. Die Affinität zu Zelloberflächen ist jedoch vom Vorhandensein des Lipidteils abhängig. Dabei muß der Lipidteil vollständig sein: schon die durch Phospholipase A₂ erfolgte Abspaltung einer Fettsäure zerstört die Fähigkeit zur Sensibilisierung von Erythrozyten. Gleichfalls stehen Micellenbildung und das Vorliegen eines intakten Lipidankers miteinander in Verbindung: Phospholipase A₂-behandeltes ECA zeigt kein "Vogelschwingen"-Muster mehr.

Durch Inkubation von gleichen Volumina Phospholipase A₂-behandeltem ECA sowie der wässrigen Phase nach Flußsäure-Behandlung von ECA mit dem isolierten ECA-Lipidteil oder mit Cephalin, konnte die Affinität zur Erythrozyten-Oberfläche nicht rekonstituiert werden (Tabelle 11: Nr.8-11). Dies kann als zusätzlicher Beweis dafür gelten, daß der Lipidteil integrierter Bestandteil des ECA-Moleküls ist und nicht ein unspezifischer Komplex mit Lipid.

Nr.	ECA aus	Behandlung mit	Inkubation mit*	Titer
1	S.montevideo	Kontrolle	Kontrolle	10240
2	"	Alkali	-	< 20
3	"	TCA	-	< 20
4	Sh.sonnei	TCA	-	< 20
5	S.montevideo	Flußsäure	-	< 20
6	"	Phospholipase A ₂	-	< 20
7	"	Lipase	-	320
8	"	Flußsäure (wässr.Phase)	Cephalin	< 20
9	"	Flußsäure (wässr.Phase)	ECA-Lipidteil	< 20
10	"	Phospholipase A ₂	Cephalin	< 20
11	"	Phospholipase A ₂	ECA-Lipidteil	< 20

Tabelle 11: Passive Hämagglutination der modifizierten ECA-Proben

Nr. 1-7: 0.1% ECA

100µl/25 µl Erythrozyten in 5 ml NaCl 0.9%

Nr. 8-11: 0.1% ECA + 1 Volumen Cephalin (Lipidanker) = 0.05%

200µl/25 µl Erythrozyten in 5 ml NaCl 0.9%

* 3 Stunden 37°C

II.3.4. Bestimmung der unteren Nachweisgrenze von ECA in der passiven Hämagglutination und in der Immunelektrophorese

Zur Absicherung der Aussage, daß der Lipidteil nicht für die Antigenität, aber für die Oberflächenaktivität von ECA von Bedeutung ist, wurde die Empfindlichkeit von Hämagglutination und Immunelektrophorese verglichen. Es sollte ausgeschlossen werden, daß das Fehlen von Titern bei vorhandener Präzipitation auf eine geringere Empfindlichkeit der Hämagglutination zurückzuführen ist. Es wurde eine Konzentrationsreihe von ECA hergestellt und die Lösungen sowohl in der Hämagglutination als auch in der Immunelektrophorese eingesetzt. Aus dem Ergebnis ist zu ersehen (Tabelle 12), daß die Hämagglutination unter den hier verwendeten Bedingungen um den Faktor 50 empfindlicher ist als die Immunelektrophorese.

ECA-Lösung	Titer	Präzipitation
0.1 %	5120	+
0.01 %	5120	+
0.005 %	2560	+
0.001 %	2560	-
0.0005 %	1280	-
0.0001 %	640	-
0.00005 %	<20	-
0.00001 %	<20	-

Tabelle 12: Nachweisgrenze von Salmonella montevideo SH94-ECA in der passiven Hämagglutination und in der Immunelektrophorese

PHA: 100 µl/25 µl Erythrozyten in 5ml NaCl 0.9%
Immunelektrophorese: 10 µl

ECA-Antiserum gegen E. coli 014 (F2387)

II.4. Zusammenfassung

Die Fettsäurezusammensetzung von ECA wurde ermittelt, dabei traten C16 und C16:1 als vorherrschende Fettsäuren auf. Ein Vergleich des Fettsäuremusters verschiedener Stämme zeigte im wesentlichen Übereinstimmung.

Der Lipidanker von ECA konnte isoliert und seine Struktur durch massenspektrometrische Analyse als Phosphoglycerid identifiziert werden. Durch Methylierungsanalyse konnte das Kohlenstoffatom C4 von GlcNAc als Bindungsstelle von Lipidanker und Aminosuckerpolymer ermittelt werden.

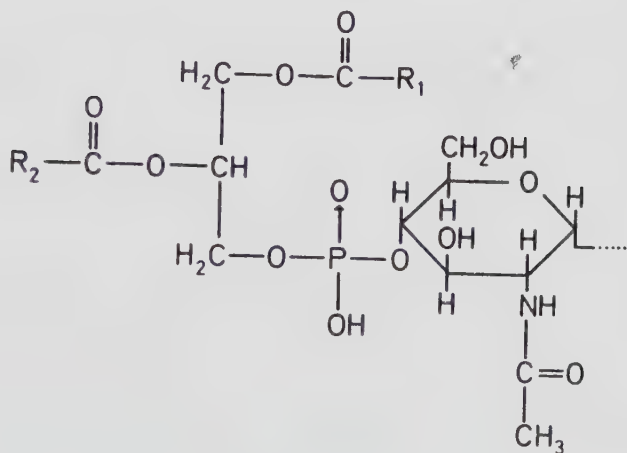
Abb. 26 zeigt einen Strukturvorschlag für den Lipidteil von ECA.

Die in der Abbildung angegebene Lokalisierung der Doppelbindung in Δ^9 wurde noch nicht abgesichert. Δ^2 C16:1 wurde jedoch eindeutig ausgeschlossen.

Die C2-Position des Lipidteils kann möglicherweise auch durch C16:0, C18:0 und C18:1 besetzt werden; entsprechende Fragmente finden sich im Spektrum des Lipidteils.

Durch chemische und enzymatische Modifizierung des ECA wurde die Bedeutung des Lipidteils für die Affinität des ECA zu Zelloberflächen gezeigt; schon die Abspaltung einer Fettsäure zerstört die Oberflächenaktivität. Die Antigenität von ECA wird durch die Abspaltung von Fettsäuren nicht beeinflusst. Abb. 27 gibt ein Modell für die Modifikation des ECA-Moleküls und deren Auswirkungen wieder.

Lipidanker von ECA



$R_1 = C16:0$

$R_2 = \Delta^9 C16:1$

Abb. 26: Lipidanker von ECA

R_2 = möglicherweise auch C16:0; C18:0; C18:1
 = Δ^9 -Position der Doppelbindung wurde noch
 nicht abgesichert

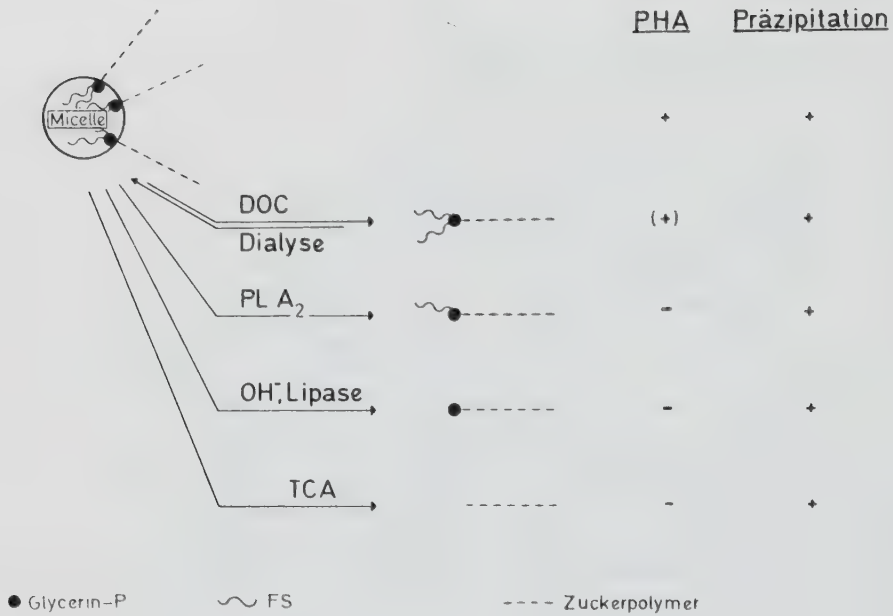


Abb. 27: Modifizierung von ECA und Auswirkungen auf die ECA-Eigenschaften

- DOC = Na-Desoxycholat
 PL A₂ = Phospholipase A₂
 OH⁻ = Alkali-Behandlung
 TCA = Trichloressigsäure
 () = DOC-behandeltes ECA kann wegen der hämolytischen Wirkung von DOC nicht in der PHA eingesetzt werden.

III. Pseudomonas-fluid-factor (PF)

In der Einleitung wurde auf den in Kulturfiltraten von Pseudomonaden entdeckten Pseudomonas-fluid-factor (PF-Faktor) hingewiesen.

Dieser zufällig entdeckte, hitzelabile Faktor -vermutlich ein Enzym- zeichnet sich durch seine selektive "Zerstörung" von ECA aus. Es sollte die Wirkungsweise von PF auf ECA untersucht werden.

III.1. Isolierung von PF und Test der PF-Aktivität

Die Isolierung von PF erfolgte nach der von Whang und Neter (160) beschriebenen Methode (siehe E.3.3.). Die Anwesenheit des Faktors wurde nach Inkubation mit ECA (siehe E.5.5.) anhand des Herabsinkens des PHA-Titers überprüft. Es wurden neben drei Ps. aeruginosa-Stämmen auch je ein Ps. syncyanea- und Ps. trifolii-Stamm eingesetzt. Ein Teil der jeweiligen PF-Lösungen wurde vor der Inkubation mit ECA auf 100°C (10 min) erhitzt; dies führte zur Zerstörung der PF-Aktivität (160). Tabelle 13 gibt die PHA-Titer der PF-behandelten ECA-Proben wieder. Nur die Ps. aeruginosa-Stämme Typ 4, 6 und 10 enthalten also den Faktor. Im weiteren wurde PF von Typ 4 verwendet; die Wirksamkeit der PF-Behandlung wurde bei jeder Probe in der passiven Häm-agglutination getestet.

Zur Vereinfachung der Aufbewahrung wurde geprüft, ob PF nach Lyophilisation wirksam bleibt. Nach der Lyophilisation wurde PF im gleichen Volumen H₂O gelöst und zur Behandlung von ECA eingesetzt. Die Wirksamkeit

wurde in der passiven Hämagglutination getestet: es trat kein wesentlicher Aktivitätsverlust auf.

ECA* inkubiert mit PF aus	Titer
Ps. syncyanea F 4184	5120
" 10 min 100°C	5120
Ps. trifolii F 4187	5120
" 10 min 100°C	5120
Ps. aeruginosa Typ 4	< 20
" 10 min 100°C	5120
Ps. aeruginosa Typ 6	< 20
" 10 min 100°C	2560
Ps. aeruginosa Typ 10	< 20
" 10 min 100°C	2560

Tabelle 13: Nachweis von PF anhand der PF-Wirkung auf ECA

* ECA aus Salmonella montevideo SH94

Je 10ml Pseudomonaden-Kulturfiltrat/ 1mg ECA

Inkubation: 72 Stunden/56°C; nach Dialyse
(24Stunden gegen Wasser) wurde
das Volumen auf 1ml eingeeengt
(ECA = 0.1%)

PHA: 100 µl Ansatz / 25 µl Erythrozyten in
5 ml NaCl 0.9%

III.2. Wirkung von PF auf ECA

Um festzustellen, ob durch PF-Behandlung Veränderungen im Aminosuckerteil von ECA auftreten, wurde das mit PF behandelte ECA (ECA-PF) hydrolysiert (4 N HCl/1h 100°C) und in der Hochspannungselektrophorese eingesetzt. GlcN und ManNUA-Lakton sind nach der PF-Behandlung noch vorhanden (Abb. 28).

Wird vom hydrolysierten ECA-PF eine Analyse im Aminosäureanalysator gemacht, zeigt sich das ECA-typische Elutionsmuster aus GlcN, Oligo A und ManNUA-Lakton (siehe: Ergebnisse C.V.1.). Der Pseudomonas-Faktor wirkt nicht auf den Aminosuckerteil von ECA. Es sollte also nach den Ergebnissen aus Teil II.3.3. eine Präzipitation mit dem PF-behandelten ECA möglich sein. PF-behandeltes ECA wurde deshalb in der Crossed-Immunelektrophorese eingesetzt.

Im Gegensatz zur Beschreibung von Whang und Neter (160), die eine Zerstörung der Antigenität von ECA durch PF festgestellt hatten, war in der Immunelektrophorese mit monospezifischem ECA-Antiserum eindeutig eine Präzipitation zu erkennen. Es trat jedoch nur ein Peak auf: eine Aggregation von ECA war nach der PF-Behandlung nicht mehr möglich (Abb. 29).

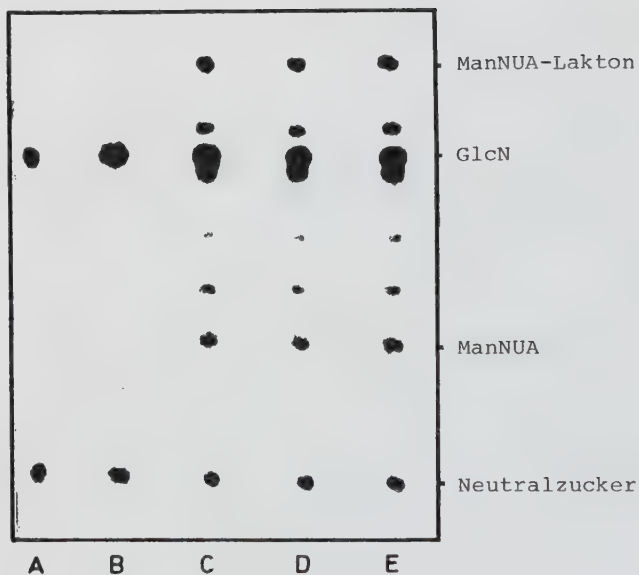


Abb. 28: Hochspannungselektrophorese von PF-behandeltem
ECA (ECA-PF)

- A = je 10 µg Glc und GlcN (Standards)
B = 150 µg PF
C = 150 µg ECA-PF (10 min 100°C) = Kontrolle
D = 150 µg ECA-PF
E = 150 µg ECA

B-E : 4N HCl/1h 100°C

HVE : pH 2.8/1h; Trevelyan-Färbung

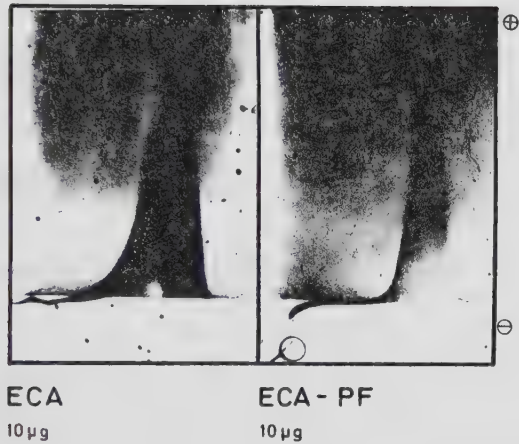


Abb. 29: Crossed Immunelektrophorese von PF-behandeltem ECA (ECA-PF)

ECA-Antiserum gegen E. coli 014 (F2387),
absorbiert mit E. coli 014 (F1327)

III.3. Charakterisierung von PF

Eine Fettsäurebestimmung des PF-behandelten ECA ergab einen Fettsäuregehalt von 4.6%. Da das als Kontrolle ebenfalls untersuchte PF einen Fettsäuregehalt von 4.1% besitzt, ergibt sich aus der Differenz ein Gehalt von etwa 0.5% Fettsäuren für ECA nach PF-Wirkung:

dieser Wert stellt nur ca 10% der als Kontrolle ebenfalls untersuchten unbehandelten ECA-Präparation dar (3.9%).

Dieses Ergebnis in Verbindung mit der Präzipitierbarkeit von PF-behandeltem ECA bei gleichzeitigem Verlust der Oberflächenaktivität deutete auf eine Wirkung von PF auf den Lipidteil des ECA hin.

Um nachzuprüfen, ob PF eine Phospholipase darstellt, wurde der *Pseudomonas*-Faktor mit Phosphatidylcholin (aus Schweineleber) inkubiert. Die Durchführung erfolgte wie bei der ECA-Behandlung. Als Kontrolle wurde Phospholipase A₂ ebenfalls mit dem Substrat inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Lipide extrahiert (E.4.10.) und in einer Dünnschichtchromatographie eingesetzt (Kieselgelplatte; Laufmittel 2; Anfärbung mit Joddampf). Bei der Kontrolle (Phospholipase A₂) traten wie zu erwarten Lysophosphatidylcholin- und Fettsäure-Flecken auf. Beim PF-behandelten Material trat Lysophosphatidylcholin nicht auf: PF ist also keine Phospholipase. Da neben nicht verwertetem Phosphatidylcholin aber Fettsäureflecken sichtbar waren, hat offensichtlich eine Abspaltung von Fettsäuren stattgefunden. PF wurde deshalb auf Esterase-Aktivität geprüft. PF wurde auf zwei Agarose-Objektträger gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknung wurde ein Objektträger zur Lokalisierung von PF mit Coomassie Brilliant-Blue angefärbt. Der zweite Objektträger wurde einer Esterase-spezifischen Färbung (E.5.4.1.) unterzogen (Abb. 30).

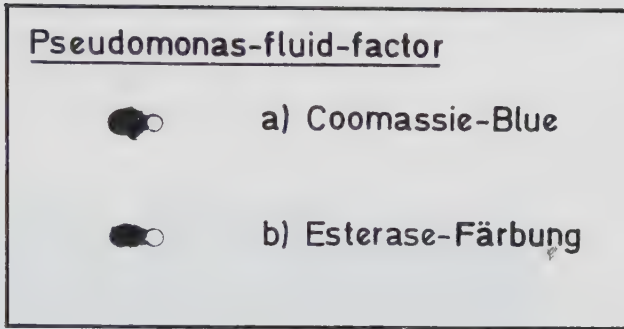


Abb. 30: Esterase-spezifische Anfärbung von PF (15)

Je 50 μ l PF; elektrophoretische Auftrennung:
60 Minuten bei 10V/cm

PF läßt sich also durch die Esterase-Färbung anfärben. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde ein photometrischer Test auf Esterase-Aktivität durchgeführt (E.5.4.2.). Der Test beruht auf der Umwandlung von Acetylsalicylsäure in die bei 300 nm absorbierende Salicylsäure durch Esterasen (43). Wegen der geringen Reaktionsgeschwindigkeit von PF wurde nach Messung des Nullwertes für 72 h bei 56°C inkubiert und erst dann erneut gemessen. Als Kontrollen wurde der Kultur-

überstand von einem PF-negativen Stamm (4187; Tabelle 12) parallel eingesetzt. Gemessen wurde gegen einen gleichbehandelten Nullwert ohne PF, um die spontan auftretende Umwandlung von Acetylsalicylsäure in Salicylsäure zu erfassen.

PF zeigte Esterase-Aktivität: während der Inkubation trat eine Extinktionsänderung von 0.008 auf 0.357 ein. Da der Überstand des PF-negativen *Pseudomonas*-Stammes diese Aktivität nicht zeigte (Extinktionsänderung : von 0.002 auf 0.004), scheint eine Gleichsetzung von PF- und Esterase-Aktivität erlaubt.

Um dies nochmals zu überprüfen, wurde der folgende Versuch gemacht: PF-behandeltes ECA wurde mit Flußsäure gespalten und nach Extraktion des Lipidteils in der Dünnschichtchromatographie untersucht. Durch die PF-Behandlung sollten die Fettsäuren abgespalten, durch die Flußsäure die Phosphodiesterbindung zwischen Aminosucker - und Lipidteil gespalten worden sein. Produkt wäre also Glycerin, das bei der Lipidextraktion in der wässrigen Phase verblieben sein müßte. In Abb. 31 ist zu sehen, daß Glycerin als Reaktionsprodukt der angegebenen Behandlung auftritt.

III.4. Zusammenfassung

Von fünf getesteten *Pseudomonas*-Stämmen enthielten nur die drei *Ps. aeruginosa*-Stämme den *Pseudomonas*-Faktor. Dieser Faktor zerstört zwar die Oberflächenaktivität von ECA, nicht aber die Präzipitierbarkeit mit ECA-Antiserum. Lyophilisation des Faktors zerstört dessen Aktivität nicht. Durch verschiedene Tests konnte der PF-Faktor

als unspezifische Esterase (oder Esterasengemisch)
identifiziert werden.

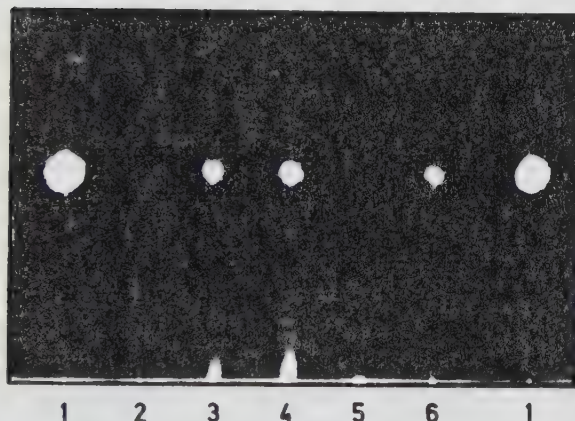


Abb. 31: Dünnschichtchromatographie von PF-behandeltem
ECA (ECA-PF) nach Abspaltung des Lipidteils
durch Flußsäure und Lipidextraktion

- 1 = Glycerin
- 2 = ECA-PF nach Flußsäure (org.Phase): 200µg
- 3 = ECA-PF nach Flußsäure (wässr.Phase): 200µg
- 4 = Lipase-behandeltes ECA nach Flußsäure
(wässr.Phase): 200µg = Kontrolle
- 5 = ECA: 1000µg = Kontrolle
- 6 = ECA (4N HCl/ 1 h 100°C): 1000 µg = Kontrolle

Kieselgelplatte (Merck); Laufmittelsystem 1;
Benzidin/Perjodat-Färbung

IV. Komplexierung von ECA mit Proteinen: Immunogenität von ECA-Protein-Komplexen

Von R. Geyer (30) wurde aus Enterobacteriaceae ein stark basisches Protein (k-Protein) isoliert, das aufgrund ionischer Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen von R-core und Lipid A befähigt ist, LPS und Lipid A zu präzipitieren. Die Komplexierung von LPS mit dem nicht bakteriellen Protein Protamin wurde bereits 1958 von Neter et al. (97) beschrieben. Das stärker negativ geladene ECA sollte ebenfalls mit basischen Proteinen komplexierbar sein; dies sollte im folgenden Teil untersucht werden.

IV.1. Agar-Doppeldiffusionstest mit Proteinen

Objektträger wurden entsprechend der Vorschrift für den Agar-Doppeldiffusionstest (E.6.7.1.) hergestellt. Eine 1%ige ECA-Lösung wurde gegen 0.1 - 5%ige Lösungen der Proteine eingesetzt. Nach Einfüllen der Lösungen wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt und nach 24 und 48 Stunden die Präzipitation kontrolliert. Das Ergebnis ist in Tabelle 14 wiedergegeben.

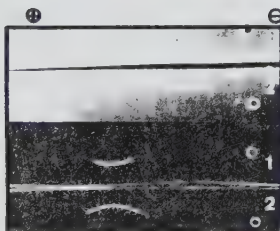
Wenn nach elektrophoretischer Auftrennung von ECA statt des Antiserums -wie in der Immunelektrophorese- Protaminsulfat eingefüllt wurde, gab es eine scharfe Präzipitationsbande, die jedoch nur im Bereich des nicht-aggregierten ECA auftrat (Abb. 32).

	ECA*
Protamin	+++
Poly-L-Lysin	++
Lysozym	+
methyliertes Albumin	++
Albumin	-
Histon II-S	-
Histon V-S (Lysin-reich)	(+)
Histon VIII-S (Arginin-reich)	-

Tabelle 14: Präzipitation von ECA aus S. monteideo SH94 mit verschiedenen Proteinen

Lösungen: ECA = 1%; Proteine 0.1-5%

* Stärke der Präzipitation in Abstufungen



Antiserum

Protaminsulfat 0.1%

1= ECA 0.1%

2= ECA 1.0%

Abb. 32: Präzipitation von ECA mit Protamin nach elektrophoretischer Auftrennung

je 10 µl ECA-Lösung 1%; 60 Minuten bei 10V/cm
ECA-Antiserum gegen E. coli 014 (F2387)

Nachdem die Möglichkeit der Präzipitation von ECA mit Proteinen gegeben war, wurden verschiedene ECA-Präparationen (siehe C.I.1. und C.II.3.) getestet.

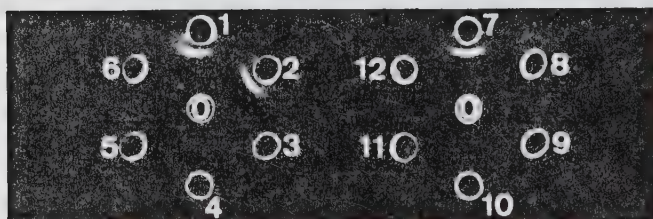


Abb. 33: Agar-Doppeldiffusionstest verschiedener ECA-Präparate mit Protamin

- 0 = Protaminsulfat
- 1 = ECA (Sh. sonnei)
- 2 = ECA
- 3 = Alkali-behandeltes ECA
- 4 = Phospholipase A₂-behandeltes ECA
- 5 = TCA-behandeltes ECA
- 6 = 37°C-Extrakt (siehe Tabelle 3)
- 7 = Nr. 6; 10fach konzentriert
- 8 = Nr. 3; 10fach konzentriert
- 9 = Nr. 4; 10fach konzentriert
- 10 = Nr. 5; 10fach konzentriert
- 11 = Lipase-behandeltes ECA
- 12 = Alkali-behandeltes LPS

0-5; 11+12 = 0.1%ige Lösungen; alle: je 10 µl eingesetzt

Herkunft des Materials (mit Ausnahme von 1):

S. montevideo SH94

Abb. 33 zeigt, daß auch ECA von Sh. sonnei (Nr. 1) mit Protamin reagiert. Da außer dem SH94-ECA und dem Sh. sonnei-ECA keine der eingesetzten Proben reagierte, wurden diese nochmals in höherer Konzentration eingesetzt (Abb. 33; Nr. 7 - 10). Nur der 37°C-Extrakt reagierte nach Konzentrierung.

Das ebenfalls eingesetzte alkalisierte LPS von SH94 (Nr. 12) präzipitierte nicht, obwohl in der Literatur von einer Komplexbildung von LPS und Protamin berichtet wird (97). Es wurden daraufhin weitere LPS-Proben von verschiedenen Stämmen getestet. Dabei zeigte sich, daß nur alkalisiertes LPS von R-Mutanten präzipitierte (nicht-alkalisiertes LPS präzipitiert mangels Diffusion im Gel gar nicht). Ausnahmen bildeten dabei Rhodospirillum tenue 2761 und Rhodopseudomonas gelatinosa 29/1: beides Wildtypstämme, deren LPS aber dem von R-Formen vergleichbar ist und mit der PCP-Methode für Rauh-Mutanten isoliert werden kann (153). Es läßt sich also sagen, daß unter den hier gewählten Bedingungen nur das PCP-extrahierbare LPS (nach Alkalisierung) mit Protamin präzipitiert. Abb. 34 zeigt die Präzipitationsmuster einiger getesteten LPS-Proben (alkalisiert).

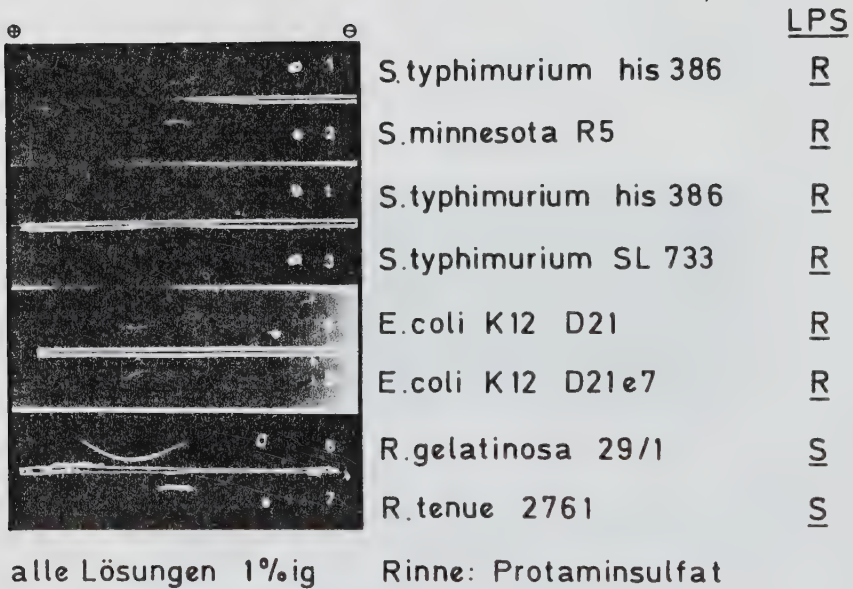


Abb. 34: Präzipitation verschiedener alkalisierter LPS-Proben mit Protamin

60 Minuten bei 10V/cm
je 10 µl

IV.2. Untersuchungen am ECA/Protamin-Komplex

Da ECA mit Protamin reagierte, sollte als nächstes nachgeprüft werden, ob das ECA-Molekül durch Protamin verändert wird oder intakt bleibt. Es wurden gleiche Mengen ECA mit unterschiedlichen Mengen Protamin gemischt und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden Erythrozyten mit den Lösungen sensibilisiert und in der passiven Hämagglutination eingesetzt. Zwei Proben wurden vor Zugabe der Erythrozyten mit Trypsin (50 µg/ml; 1 h 37°C) und eine bereits vor Zugabe von Protamin mit den Erythrozyten inkubiert.

Wie Tabelle 15 zu entnehmen ist, wird die Hämagglutination von ECA bei einem Verhältnis von ECA : Protaminsulfat von 1:0.075 gehemmt. Oberhalb des Verhältnisses von 1:0.1 waren die Titer nicht ablesbar, da alle Verdünnungsstufen inklusive der Kontrollen (ohne ECA-Antiserum) ein der Hämagglutination entsprechendes Aussehen hatten. Roth und Frumin (122) berichteten, daß nicht-sensibilisierte Erythrozyten durch 10 mg Protaminsulfat/ml agglutiniert werden, antikörperbeladene dagegen schon durch 800 µg/ml; dieses Phänomen wurde hier bereits bei einer Konzentration von 10 µg/ml beobachtet.

Die Trypsin-behandelten Proben zeigten keinerlei Veränderung gegenüber der Kontrolle ohne Protamin: damit konnte eine Veränderung am ECA-Molekül durch Protamin ausgeschlossen werden.

ECA* : Protaminsulfat (w/w)	Titer
1 : 0.01	5120
1 : 0.025	5120
1 : 0.05	2560/5120
1 : 0.075	1280
1 : 0.1	1280
1 : 0.5	nicht ablesbar
1 : 1.0	nicht ablesbar
1 : 5	nicht ablesbar
1 : 0.1 + Trypsin (50 µg/ml; 1 h 37°C)	5120
1 : 5.0 + Trypsin (50 µg/ml; 1 h 37°C)	5120
ECA + Erythrozyten (1 h/37°C) + Protaminsulfat (1:0.1)	5120
1 : 0 = Kontrolle	5120

Tabelle 15: Effekt von Protamin auf die passive Hämagglutination von ECA

* je 100 µg pro 25 µl Erythrozyten in 5 ml NaCl 0.9%

Um festzustellen, ob die Reaktion von ECA und Protamin auf ionischen Wechselwirkungen beruht, wurde versucht, die Komplexbildung mit NaCl zu hemmen. Dazu wurde jeweils 0.1 mg ECA mit steigenden Mengen Protaminsulfat gemischt und mit dest. H₂O auf ein Volumen von 0.7 ml gebracht. In einem Parallelansatz wurde statt H₂O mit 1 N NaCl aufgefüllt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 650 nm photometrisch bestimmt. NaCl hemmt die Komplexbildung völlig (Abb. 35), was auf eine ionische Interaktion zwischen Polyanion (ECA) und Polykation (Protamin) als Ursache der Komplexbildung schließen läßt.

Mit alkalisiertem ECA konnte ebenfalls keine Absorptionzunahme festgestellt werden; dies deckt sich mit dem Ergebnis des Agar-Doppeldiffusionstest (Abb. 33), bei dem die deacylierten Proben nicht präzipitierten. Da die durch Komplexbildung aufgrund ionischer Interaktionen hervorgerufene Präzipitation am stärksten bei hohem Molekulargewicht beider Partner ist, ist vermutlich das herabgesetzte Molekulargewicht Ursache des Fehlens von Präzipitation bei den deacylierten Proben.

Daß aber außer durch ionische Wechselwirkungen eine Komplexbildung von ECA und Protein auch über hydrophobe Interaktionen möglich ist, zeigt Tabelle 14: mit methyliertem Albumin ist eine gute Präzipitation zu beobachten, nicht jedoch mit nativem Albumin.

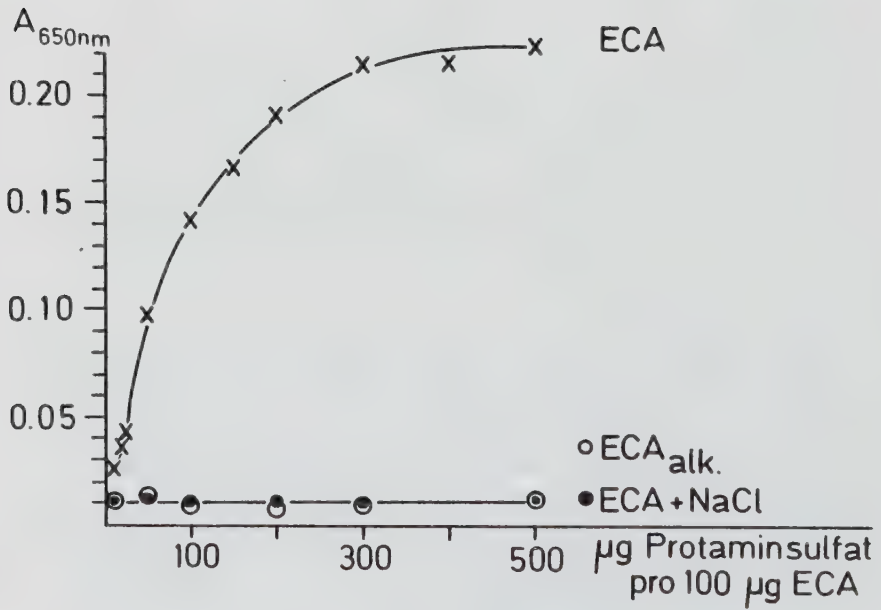


Abb. 35: Hemmung des ECA/Protamin-Komplexes durch NaCl

ECAalk = Alkali-behandeltes ECA

ECA + NaCl = ECA in 1N NaCl gelöst

Trübungsmessung bei 650 nm

IV.3. Immunisierung mit ECA/Protein-Komplexen

Wie bereits ausgeführt wurde, ist gereinigtes ECA bei i.v.-Immunisierung von Kaninchen nicht immunogen. Immunisierungen wurden bisher mit ganzen Zellen von immunogenen Stämmen oder mit nicht-gereinigten Rohfraktionen nicht-immunogener Stämme durchgeführt. Domingue und Johnson (22) konnten die Immunogenität ihrer Rohfraktion durch Erhitzen zerstören; ECA ist hingegen sehr hitze-stabil. Eine ebenfalls immunogene ECA-Präparation von Marx und Petcovici (85) hat einen Proteingehalt von 15%. Beides deutet darauf hin, daß die Immunogenität von ECA an ein Protein als assoziierenden Partner gebunden ist.

Durch die Komplexbildung mit Proteinen war nun die Möglichkeit gegeben, die Immunogenität von gereinigtem ECA als ECA/Protein-Komplex im Tierversuch zu testen. Kaninchen wurden mit steigenden Mengen ECA/Protaminsulfat im in Tabelle 16 angegebenen Verhältnis immunisiert (Immunisierungsschema: siehe E.6.1.). Tabelle 16 gibt das Ergebnis der Titerbestimmung der so gewonnenen Seren wieder.

Nach Komplexierung mit Protamin ist es also möglich, mit gereinigtem ECA eine Immunantwort im Kaninchen zu erhalten. Dabei scheint ein Verhältnis von ECA : Protaminsulfat von 1:1 besonders geeignet; eine Erhöhung der Protaminmenge führte zu keiner Verbesserung des Titers. Wurden zur Immunisierung insgesamt Komplexmengen von $>3040/3040 \mu\text{g}$ (Nr. 8; 9; 10) verwendet, erhielt man Titer von $10240/20480$. Dies entspricht dem Titer guter Seren nach Immunisierung mit ECA-immunogenen Stämmen. Die Seren mit Titern >5120 präzipitier-

ten auch, wenngleich sehr schwach.

Wurde vor oder nach Immunisierung mit dem Komplex ECA ohne Protaminsulfat injiziert, veränderte sich der Titer nicht.

Eine passive Hämagglutination mit alkalisiertem LPS von

Nr.	Verhältnis ECA/Protaminsulfat	Gesamtmenge (µg)		PHA	
		ECA	Protaminsulfat	Null-titer	End-titer
1	2 : 1	240	120	<10	160
2	1 : 1	240	240	<10	320
3	1 : 2	240	480	<10	320
4	1 : 3	240	720	<10	320
5	1 : 4	240	960	<10	320
6	1 : 1	2880	2880	<10	2560/5120
7	1 : 1	3040	3040	<10	5120
8	1 : 1	3200	3200	<10	10240
9	1 : 1	3820	3820	<10	10240/20480
10	1 : 1	5120	5120	<10	10240/20480
11		-	720	<10	<10
12		240	-	<10	<10

Tabelle 16: Titer-Bestimmung der Seren nach Immunisierung mit ECA/Protaminsulfat

Seren: i.v.-Immunisierung von Kaninchen

Immunisierungsschema siehe E.6.1.

je 100µl ECA 0.1%/25 µl Erythrozyten in 5 ml
NaCl 0.9%

S. monteideo SH94 ergab, daß die Seren auch einen Titer gegen das LPS haben, der aber mit maximal 320 weit unter dem ECA-Titer liegt. Als Kontrolle wurden die Seren daraufhin auf Titer gegen ein fremdes LPS (S. typhimurium 2386/74) getestet. Da auch dabei Titer von 160/320 auftraten, ist der LPS-Titer der Seren wohl eher auf eine polyklonale Stimulation der B-Lymphozyten denn auf eine LPS-Verunreinigung des ECA zurückzuführen. ♣

Eine zweite Immunisierungsreihe, bei der statt Protaminsulfat methyliertes Albumin verwendet wurde, ergab ebenfalls eine Immunantwort auf ECA. Doch waren die Titer nicht annähernd so hoch wie beim Einsatz des Protamin-komplexes (Tabelle 17). Auch bei dieser Immunisierungsserie traten niedrigere Titer sowohl gegen das LPS von SH94 als auch gegen das von S. typhimurium auf (Immunisierungsschema siehe E.6.1.) .

Nr.	Verhältnis ECA/meth. Albumin	Gesamtmenge (µg)		PHA	
		ECA	meth. Albumin	Null- Titer	End- Titer
13	1 : 1	2420	2420	<10	1280
14	1 : 1	5680	5680	<10	5120
15	1 : 1 *	7360	5360	<10	5120

Tabelle 17: Titerbestimmung der Seren nach Immunisierung mit ECA/meth. Albumin

Seren: i.v.-Immunisierung von Kaninchen.
Immunisierungsschema siehe E.6.1.

* Nr. 15 wurde mit ECA/meth. Albumin=1:1
immunisiert und mit 2 mg ECA nach-
immunisiert

PHA: je 100µl ECA 0.1%/25µl Erythrozyten
in 5 ml NaCl 0.9%

IV.4. IgG-Anteil der Seren

ECA-Antikörper nach i.v.-Immunisierung von Kaninchen gehören überwiegend der IgM-Klasse an (162). Versuche, den IgG-Anteil durch Variation der Immunisierungstechnik zu erhöhen, waren bisher erfolglos (118).

Um zu prüfen, ob die durch Immunisierung mit dem ECA/Protamin-Komplex gewonnenen Antikörper ebenso größtenteils der IgM-Klasse angehören wie die mit ganzen Zellen erhaltenen, wurden drei der Seren (Nr. 8, 9, 10 aus Tabelle 16) mit Dithiothreitol (DDT) versetzt, um die IgM-Antikörper zu inaktivieren (E.6.4.). Die so behandelten Seren wurden in der passiven Hämagglutination getestet. Als Kontrolle wurde ein gut-präzipitierendes Serum einer Immunisierung mit ganzen Zellen eingesetzt.

Serum-Nr. (Tabelle 16)	Titer Vollseren	Titer IgM-inaktivierte Seren
8	10240	80
9	10240/20480	80
10	10240/20480	160
Kontroll- Serum	2560	1280

Tabelle 18: IgM-inaktivierte Seren in der passiven Hämagglutination

Inaktivierung: 1 ml Dithiothreitol 0.01 M in
PBS, pH 7.4/ml Serum
100 µl ECA 0.1%/25 µl Erythrozyten in 5ml
NaCl 0.9%

Tabelle 18 ist zu entnehmen, daß der IgG-Anteil der Seren sehr gering ist. Zwar muß berücksichtigt werden, daß in der PHA überwiegend IgM-Antikörper erfaßt werden (46); doch ist beim Vergleich mit dem gut-präzipitierenden Antiserum (Kontrolle) der geringe IgG-Anteil der Seren 8, 9, 10 deutlich erkennbar.

IV.5. Zusammenfassung

ECA kann mit Proteinen im Agar-Doppeldiffusionstest präzipitiert werden. Die Reaktion mit Protamin führt zu keiner Veränderung am ECA-Molekül; nach Trypsin-Verdauung des Proteins sind Antigenität und Oberflächenaktivität von ECA unverändert. Die Komplexbildung mit Protamin läßt sich mit NaCl hemmen.

Komplexbildung mit Proteinen ist ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen möglich: methyliertes Albumin präzipitiert ECA, natives Albumin nicht.

Immunisierung von Kaninchen mit ECA/Protein-Komplexen führt zu einer Immunantwort auf das sonst nicht immunogene, gereinigte ECA. Benutzt man Protamin als assoziierenden Partner, lassen sich gute Anti-ECA-Titer erzielen. Die so erhaltenen Antikörper gehören hauptsächlich der IgM-Klasse an.

Von den getesteten alkalisierten LPS-Proben wurden nur die PCP-extrahierbaren durch Protamin präzipitiert.

V. Untersuchungen am Aminosuckerpolymer von ECA

Der Polysaccharidstrang von ECA wurde von Männel und Mayer (79) aufgrund einer Methylierungsanalyse als unverzweigte Kette 1.4-gebundener alternierender Einheiten von GlcNAc und ManNAcUA beschrieben. Bei dem serologisch und weithin auch chemisch identischen ECA aus Sh. sonnei fanden Ługowski und Romanowska (70) jedoch ein Verhältnis der beiden Aminosucker GlcNAc: ManNAcUA von 1:2. In beiden Fällen konnte die Quantifizierung der ManNUA wegen ihrer Säurelabilität nur indirekt durch Extrapolation gemacht werden. PMR-Studien von Männel und Mayer in Zusammenarbeit mit Prof. Friebohn ließen wegen starken Rauschens im Bereich der β -ständigen anomeren Protonen keine Aussage über die Größe der "repeating unit" des ECA zu.

Um mögliche Unterschiede zwischen den beiden Präparationen (ECA aus S. montevidео nach der PW/PCP-Extraktion und ECA aus Sh. sonnei nach der Extraktionsmethode von Ługowski und Romanowska) festzustellen, wurde teilweise in Zusammenarbeit mit E. Romanowska ein direkter Vergleich beider Präparate vorgenommen.

V.1. Elutionsprofil von ECA-Partialhydrolysaten im Aminosäureanalysator

Hexosaminuronsäuren lassen sich im Aminosäureanalysator auftrennen und quantifizieren. Untersuchungen verschiedener isolierter Hexosaminuronsäuren sowie Standardsubstanzen ergaben, daß die getesteten Aminuronsäuren im Aminosäureanalysator gut zu trennen sind. Werden die Elutionszeiten der Uronsäuren bei Verwendung von GlcN

	<u>Beckmann 120B*</u>		<u>Durrum D 500*</u>		
	min	%	min	(min)**	%
GlcN	180'	100	52'30"		100
TalNUA	n.d.	-	42' 21"	(74' 20")	81
GalNUA	131'	73	41' 41"	-	79
GalNUA	123'	68	39' 07"		75
ManNUA	88'	49	26' 30"	(81' 31")	50
GlcNUA	82'	46	23' 33"	(82' 25")	45
AltNUA	76'	42	n.d.		-
MurNA	60'	33	15' 18"		29

Tabelle 19: Hexosaminuronsäuren im Aminosäureanalysator (90)

Vergleich der Elutionszeiten bei den Geräten Beckmann 120B und Durrum D-500

Hexosaminuronsäuren von Talose, Gulose, Galaktose, Mannose, Glucose und Altrose.
MurNA = Muraminsäure

* Elutionszeiten -in min sind absolute Werte
-in % sind bezogen auf
GlcN = 100%

** () = Elutionszeiten der Laktone

als internen Standard auf diesen Standard bezogen, dann sind die Ergebnisse genau reproduzierbar. Damit ist eine Identifizierung der Aminuronsäuren anhand der Differenz ihrer Elutionszeiten zum GlcN möglich (Tab. 19).

Bei der Untersuchung von ECA-Partialhydrolysaten (S. montevideo SH94) im Aminosäureanalysator zeigte sich ein reproduzierbares Profil. Dabei konnte die ManNUA trotz ihrer Säurelabilität (114) nachgewiesen werden, da sie unter den Bedingungen der Säurehydrolyse die Tendenz zur Laktonbildung zeigt (bei 0.1N HCl/ 1 Stunde 100°C : bis zu 90% Ausbeute an Lakton) und dieses Lakton im Aminosäureanalysator ebenfalls eluierbar ist (siehe Tabelle 19).

Es interessierte nun, ob das aus Sh. sonnei erhaltene Material in gleicher Weise eluiert wird. Dazu wurden gleiche Mengen beider ECA-Präparate hydrolysiert (4 N HCl/ 1 h 100°C) und die zur Trockne eingedampften Hydrolysate im Aminosäureanalysator eingesetzt (E.4.1.5.).

Die Elutionsprofile beider Präparate zeigen im wesentlichen Übereinstimmung (Abb. 36). Das Material von Sh. sonnei zeigt aber einen insgesamt höheren Gehalt an Aminozyklankern als das ECA von S. montevideo. Dies ist in Übereinstimmung mit der besseren Wasserlöslichkeit des Sh. sonnei-Produktes gegenüber dem von *Salmonella* (siehe dazu Tabelle 2). Neben GlcN und dem Lakton der ManNUA tritt eine dritte Kompo-

Auch ECA aus E. coli K-12 und O8⁻:K27⁻ zeigt nach Hydrolyse dieses Elutionsprofil (Abb. 37).

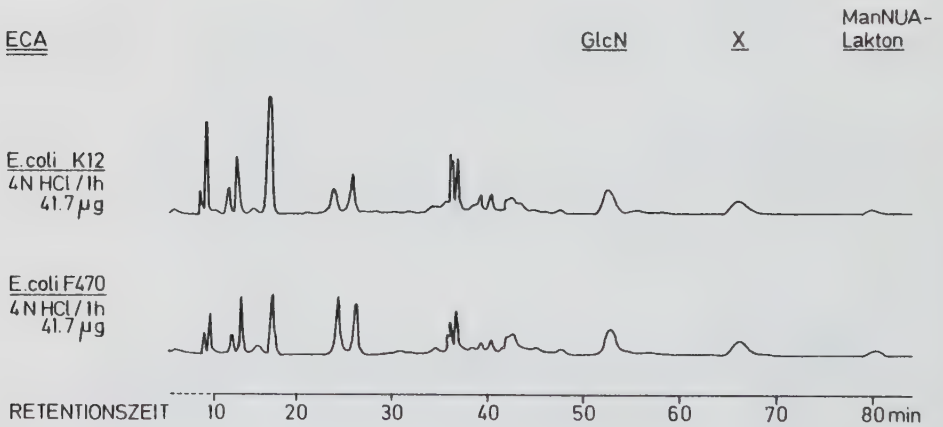


Abb. 37: ECA-Hydrolysate aus E. coli K-12 und E. coli O8⁻:K27⁻ im Aminosäureanalysator

P2-Programm

Bei der Untersuchung der Hydrolysate von Rohfraktionen (Überstände nach Kochen von lyophilisierten Zellen) im Aminosäureanalysator zeigte sich, daß trotz Überladung im Bereich niedriger Elutionszeiten (<50 Minuten) ECA-haltige Rohfraktionen anhand des gemeinsamen Auftretens von GlcN, "X" und ManNUA-Lakton identifiziert werden können. Obwohl der Gehalt an diesen drei Komponenten in den verschiedenen ECA-Präparaten und Rohfraktionen unterschiedlich ist, kann das gemeinsame Auftreten als ECA-typisch angesehen werden und die Untersuchung von Hydrolysaten im Aminosäureanalysator als "fingerprinting" zum raschen Nachweis von ECA verwendet werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Komponente "X", da in diesem Bereich keine Aminosäuren, Aminozucker oder Aminuronsäuren eluieren.

ManNUA tritt im Aminosäureanalysator aus bisher ungeklärten Gründen als Doppelpeak auf; durch Einsatz eines synthetischen Mannosaminuronsäure-Derivates (α -Benzyl-N-Carbobenzoxy-D-ManNUA) konnte eine Verunreinigung als Ursache des Doppelpeaks ausgeschlossen werden. Der ManNUA-Doppelpeak findet sich an der gleichen Stelle wie die Aminosäuren Glycin und Alanin, so daß bei der quantitativen Auswertung mögliche Verunreinigungen durch diese Aminosäuren miterfaßt werden. Aus diesem Grunde wurde ECA von SH94 mit L-Aminosäure-Oxidase behandelt (E.5.3.) und das so behandelte Produkt nach Hydrolyse (4N HCl/1 h 100°C) ebenfalls im Aminosäureanalysator eingesetzt. Eine Abnahme des Doppelpeaks gegenüber der unbehandelten Kontrolle konnte dabei nicht festgestellt werden.

Eine Aussage über das Verhältnis von GlcN zu ManNUA konnte anhand der Elutions-Profile dennoch nicht gemacht werden: einerseits wird während der Hydrolyse ein Teil

von ManNUA zerstört; bereits bei schwächerer Hydrolyse mit 0.1 N HCl konnte Perkins nach einer Stunde nur ca. 85%, nach 3 Stunden nur noch ca. 50% der Ausgangsmenge nachweisen (114). Andererseits sind für die ManNUA und deren Lakton die Extinktionskoeffizienten nicht bekannt, so daß die angegebenen Mengen mit dem Extinktionskoeffizienten von GlcN berechnet wurden und somit nur Vergleichswerte darstellen. Von Hexosaminuronsäuren ist aber bekannt (114), daß sie -im Gegensatz zu Hexosaminen- mit Ninhydrin eine orange-braune Färbung geben und deshalb im Aminosäureanalysator schlechter absorbieren als GlcN, so daß der tatsächliche Wert an ManNUA und deren Lakton höher liegt.

V.2.Methylierungsanalyse von ECA

Zum weiteren Vergleich wurden beide ECA-Präparationen einer Methylierungsanalyse unterzogen. Um auch die ManNAcUA zu erfassen, wurden die Substanzen vor der Methylierung mit Carbodiimid umgesetzt (E.4.5.) und das entstehende Lakton der ManNUA anschließend bei konstantem pH 7 mit NaBH_4 reduziert(E.4.6.) und nach Dialyse gegen Wasser lyophilisiert; mit dieser Methode läßt sich die Mannosaminuronsäure in ManN überführen (149). Die Reaktion ist aber nicht vollständig, da es teilweise wieder zur Laktonöffnung kommt.

Die Reduktion der ManNUA wurde anhand des Auftretens von ManN im Aminosäureanalysator überprüft. Nach zweimaliger Wiederholung von Laktonisierung und Reduktion trat keine Erhöhung des ManN-Gehaltes mehr ein.

Wie aus Abb. 38 zu ersehen ist, tritt nach der dreifachen Reduktion mehr ManN als GlcN auf: da neben der ManN noch nicht-reduzierte ManNUA vorliegt, kann im ECA nicht das von Männel und Mayer beschriebene 1:1-Verhältnis der beiden Aminozucker vorliegen.

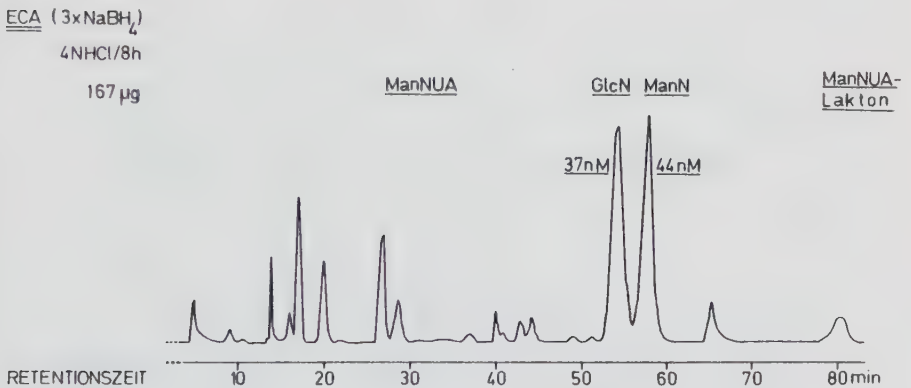


Abb. 38: ECA aus Salmonella montevideo SH94 (3 x reduziert): Profil des Hydrolysates im Aminosäureanalysator

P2-Programm

Die reduzierten ECA-Präparate wurden nach Hakomori methyliert, hydrolysiert und -nach Reduktion mit NaBD₄- peracetyliert (E.4.8.1.-4.8.4.). Das Produkt dieser Behandlung sollte an allen C-Atomen mit vormalig freien Hydroxylgruppen sowie an der N-Acetylaminogruppe methyliert sein und an allen C-Atomen, die an der Bindung im Zuckerpolymer beteiligt waren, eine O-Acetylgruppe tragen. Die Untersuchung der Substanzen mit GC/MS bestätigte die Ergebnisse von Männel und Mayer: in beiden Präparationen traten die beiden 3,6-di-O-methyl-2-deoxy-2-N-methylacetamido-1,4,5-tri-O-acetyl-alditole von GlcNAc und ManNAc auf. Zusätzlich fand sich jedoch ein nur in 3-Stellung methyliertes Hexosaminitolacetat; dieses wäre bei der von Männel und Mayer verwendeten GC-Säule nach einer extrem langen Retentionszeit eluiert worden und wurde deshalb damals nicht entdeckt. Um festzustellen, ob dieses Hexosaminitolacetat aus GlcNAc oder ManNAcUA entstanden ist, wurde ECA ohne vorherige Reduktion der Methylierung unterzogen. Auch das nicht-reduzierte ECA enthielt das nur in 3-Stellung methylierte Hexosaminitol. Dieses konnte somit als 3-O-methyl-2-deoxy-2-N-methylacetamido-1,4,5,6-tetra-O-acetyl-glucitol identifiziert werden.

Das Monomethyl-glucosaminitolacetat könnte möglicherweise durch nicht-vollständige Methylierung entstanden sein; dagegen spricht aber, daß die primäre Hydroxylgruppe an C6 der Methylierung am leichtesten zugänglich ist und gerade diese nicht methyliert wurde. Das Monomethyl-glucosaminitolacetat stellt somit vermutlich einen Verzweigungspunkt in der Aminosukerkette dar. Das Aminosukerpolymer von ECA wäre demnach nicht, wie von Männel und Mayer beschrieben, unverzweigt. Um eine Un-

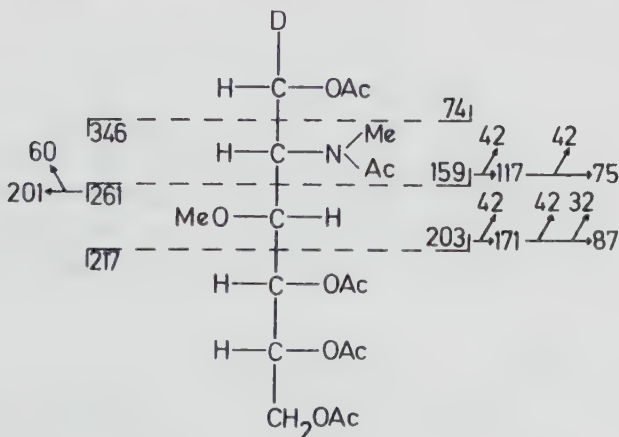
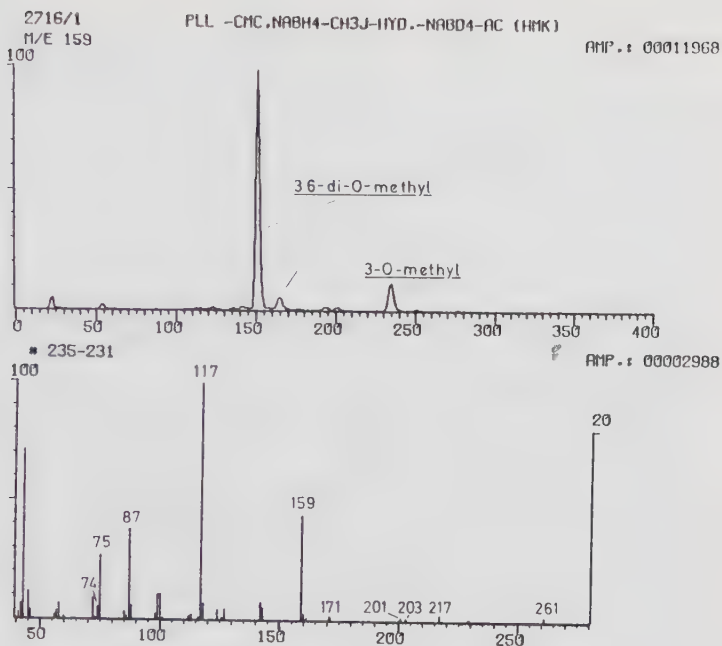


Abb. 39: Massenchromatographie der Masse m/e 159 und Massenspektrum sowie Fragmentierungsschema von Monomethylglucosaminitolacetat

GC/MS: cpTM-SIL 5-Säule; 70 eV;
205°-250°C: 6°C/min

termethylierung völlig auszuschließen, sind aber noch weitere Untersuchungen nötig.

V.3. Versuche zur Identifizierung der terminalen Zucker

Weder von Männel und Mayer noch bei der hier durchgeführten Methylierungsanalyse konnte ein endständiger Zucker im Polymer entdeckt werden. Nach Isolierung des Lipidankers von ECA war zwar nun geklärt, daß ein Ende (vermutlich das nicht-reduzierende) der Zuckerkette mit dem Phosphoglycerid substituiert ist, die Identifizierung des zweiten Endes stand aber noch aus.

V.3.1. Reaktion mit Lektinen

ECA aus S. montevideo (0.1 und 1%ige Lösungen) wurde im Agar-Doppeldiffusionstest mit Lektinen (0.1 und 0.3%ige Lösungen) getestet. Die Reaktivität dieser Lektine mit terminalen Zuckern nimmt folgendermaßen ab:

Wheat-germ-

Agglutinin: $(\text{GlcNAc})_3$ > $(\text{GlcNAc})_2$ > GlcNAc

Concanavalin A: $\alpha\text{-D-Man}$ > $\alpha\text{-D-Glc}$ > $\alpha\text{-D-GlcNAc}$

ECA reagierte mit keinem der Lektine. R-Lipopolysaccharide mit terminalem GlcNAc reagieren dagegen deutlich mit Wheat-germ-Agglutinin und -falls α -gebunden- auch mit Concanavalin A (1).

V.3.2. Kopplung des reduzierenden Endes mit einer fluores- zierenden Komponente

Von Hase et al. (38; 39) wurde eine Methode beschrieben, bei der das reduzierende Ende von Oligosacchariden durch reduktive Aminierung mit Na-Cyanoborohydrid mit 2-Aminopyridin gekoppelt wird. Nach Hydrolyse des 2-Aminopyridin-gekoppelten Oligosaccharides und Auftrennung (HVE, DC), kann der reduzierende Zucker unter einer UV-Lampe identifiziert werden. ¶

Es wurden Glc und GlcN als Standardsubstanzen und ECA aus S. montevideo und Sh. sonnei mit der fluoreszierenden Komponente gekoppelt (E.4.7.). Nach Hydrolyse (4 N HCl, je 1, 4 und 18 Stunden bei 100°C) und Trocknung wurden die Proben in der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Kieselgelplatte; Laufmittel 4) und unter der UV-Lampe die fluoreszierenden Flecken markiert.

Die Standardsubstanzen zeigten je zwei, die beiden ECA-Hydrolysate einen fluoreszierenden Fleck. Nach Anfärbung mit alkalischer Silbernitratlösung zeigte sich jedoch, daß die fluoreszierenden Flecken von ECA (wie auch je einer der Standards) nicht anfärbten: sie stellen den auch von Hase beschriebenen nicht-gekoppelten Aminopyridin-Überschuß dar. Der Nachweis eines reduzierenden Endes war mit dieser Technik nicht möglich.

V.3.3. Nachweis von Glycerin

Ein Hinweis auf das Vorkommen von Glycerin als Bestandteil von ECA hatte sich bereits bei der Untersuchung des PF-Faktors ergeben: auch beim nicht-PF-behandelten ECA trat ein - wenn auch mengenmäßig geringer- Glycerin-Fleck auf (siehe Abb. 31). Um festzustellen, ob die ECA-Zuckerkette mit Glycerin substituiert ist, wurde die nach Flußsäurebehandlung gewonnene wässrige Phase (siehe C.II.2.1.) auf Glycerin überprüft. Nach Hydrolyse (4 N HCl/ 1 h 100°C) und Trocknung wurde das Material in der Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

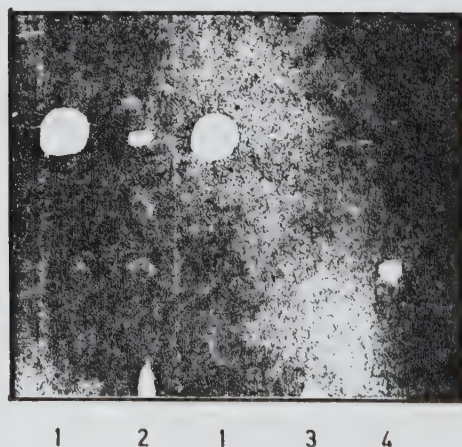


Abb. 40: Dünnschichtchromatographie von Flußsäure-behandeltem ECA (wässrige Phase)

1 = Glycerin

2 = ECA nach Flußsäure (wässrige Phase) :
4N HCl/1 h 100°C; 400 µg

3 = GlcN; 50 µg

4 = Glc; 50 µg

Kieselgelplatte; Laufmittel 1; Benzidin-Natriummetaperjodat

Auf der Abbildung der DC-Platte (Abb. 40) ist Glycerin deutlich erkennbar. Da der Lipidanker vorher abgespalten worden war (und auch keine Alkali-Behandlung zur Abspaltung von Fettsäuren an dem Material durchgeführt worden war), kann also gesagt werden, daß nicht-acyliertes Glycerin Bestandteil des Aminosukkerpolymers ist. Um dieses Ergebnis abzusichern, wurden unbehandeltes ECA und wässrige Phase nach Flußsäure-Behandlung einer Perjodatoxidation unterzogen (E.4.12.). Dabei wird jede CH_2OH -Gruppierung von Glycerin in Formaldehyd überführt; dieses kann mit Chromotropsäure photometrisch bestimmt werden (E.4.3.5.). Da die Proben nicht alkalisiert waren, sollte nur unsubstituiertes Glycerin erfaßt werden. In beiden Proben ließ sich Glycerin nachweisen; die Meßwerte waren identisch. Der Einsatz der wässrigen Phase nach Flußsäure stellte sicher, daß das erfaßte Glycerin vom Zuckerteil des ECA stammt. Möglicherweise ist das terminale Ende der Zuckerkette mit Glycerin substituiert. Diese Frage soll demnächst mit Hilfe einer Glycerin-auxotrophen Mutante untersucht werden.

V.4. ^{13}C -NMR-Spektroskopie von ECA

80 mg ECA von S. monteideo SH94 wurden alkalisiert und dann von Zugowski im Labor von Dr. Jennings, Ottawa, in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Abb. 41 zeigt das NMR-Spektrum von ECA; dieses stimmt im wesentlichen mit

dem des ebenfalls untersuchten ECA von Shigella sonnei überein (E. Romanowska, pers. Mitteilung). Im anomeren Bereich finden sich vier Signale im Verhältnis 1:2:1:1. Dadurch wird die Möglichkeit eines Disaccharides als "repeating unit" von ECA eindeutig ausgeschlossen.

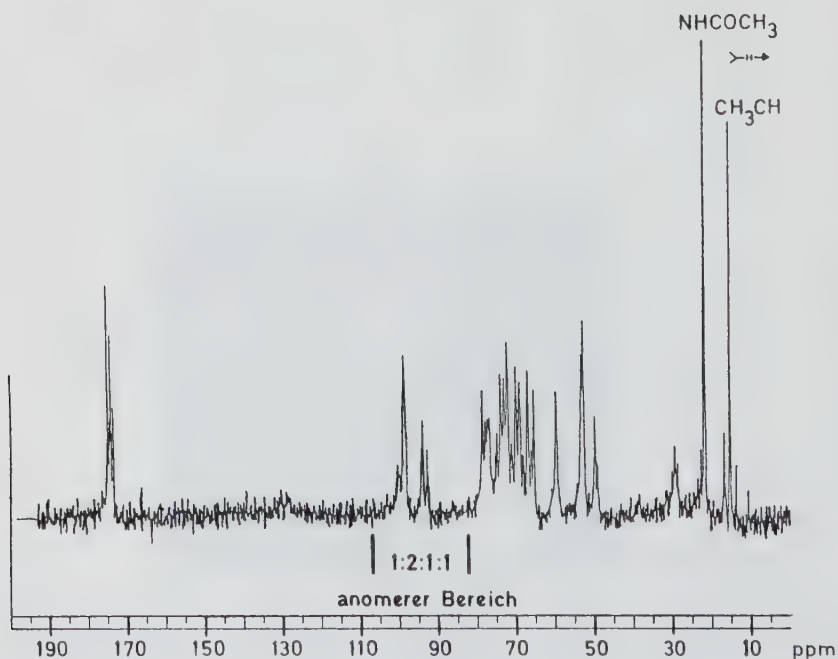


Abb. 41: ^{13}C -NMR-Spektrum von ECA aus Salmonella montevideo SH94

V.5.Charakterisierung eines Oligosaccharides aus Partialhydrolysaten von ECA

Da die durchgeführte Methylierung keine Klarheit über die Größe der "repeating unit" und die Struktur des Aminosackerpolymer ergab, wurde im weiteren der Weg der Strukturaufklärung über die Analyse von Teilstrukturen gewählt. Bei der Partialhydrolyse von ECA entstehen wegen der Stabilität der Aminuronsäurebindung Oligosaccharide: ein in guter Ausbeute entstehendes Oligosaccharid konnte isoliert und charakterisiert werden.

V.5.1.Isolierung eines Oligosaccharides (= Oligo A)

V.5.1.1.Hydrolysebedingungen für die Isolierung

Für die Untersuchung wurde das in Abb. 42 mit Oligo A bezeichnete Oligosaccharid gewählt. Vor der Isolierung des Oligosaccharides mußten die Hydrolysebedingungen für ECA ermittelt werden, bei denen eine optimale Ausbeute an Oligo A zu erreichen ist. Dazu wurden gleiche Mengen ECA mit 1 N und 4 N HCl je 1, 4, 8 und 18 Stunden hydrolysiert und die Hydrolysate in der Hochspannungselektrophorese aufgetrennt. Die beste Ausbeute an Oligo A wurde nach 18stündiger Hydrolyse mit 1 N HCl erreicht.

ECA S. monteideo SH94

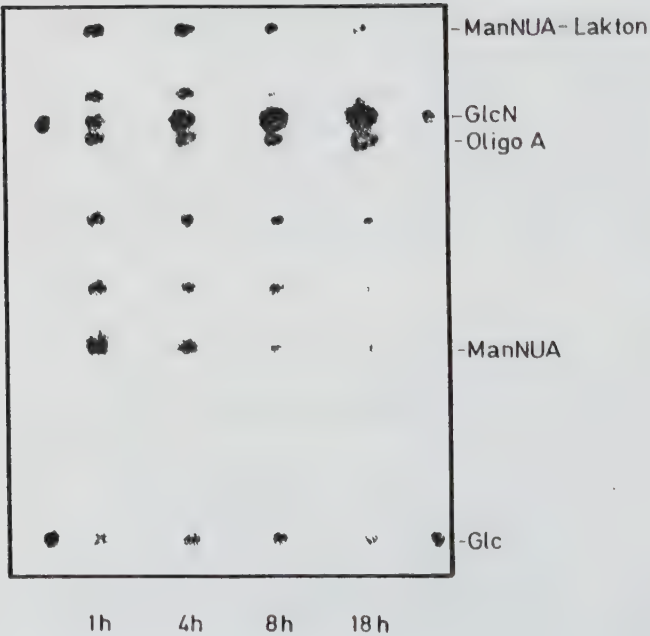


Abb. 42: ECA-Hydrolysate von Salmonella monteideo SH94
in der Hochspannungselektrophorese

je 100µg ECA

Hydrolyse: 1N HCl/100°C

HVE: pH 2.8/1h; Trevelyan-Färbung

V.5.1.2. Isolierung und Reinigung von Oligo A

Größere Mengen von ECA wurden nach den oben ermittelten Bedingungen hydrolysiert und in der präparativen Hochspannungselektrophorese eingesetzt. Wegen der Überlappung von Oligo A und GlcN (Abb. 42) wurden Teile von GlcN miteluiert. Das Material wurde deshalb durch absteigende Papierchromatographie (E.4.1.1.) weiter aufgetrennt: hierbei ließ sich Oligo A ($R_{\text{GlcN}} = 0.15$) gut von GlcN trennen. Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz über eine Dowex WX50-2 Säule gegeben (E.4.13.). Abb. 43 zeigt das Schema zur Isolierung von Oligo A und dessen Ausbeute.

Isolierung von Oligo A

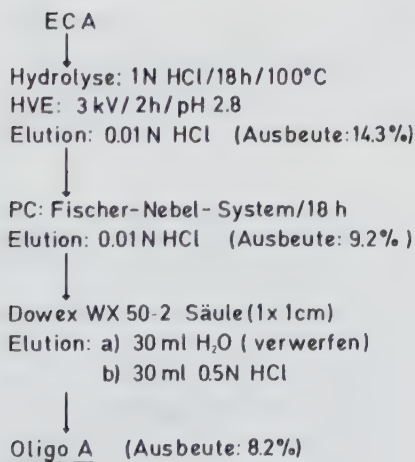


Abb. 43: Isolierung und Reinigung von Oligo A

Isoliertes Oligo A wurde im Aminosäureanalysator eingesetzt. Wie aus Abb. 44 zu ersehen ist, stellt Oligo A die in Abschnitt C.V.1. mit "X" bezeichnete Komponente im Aminosäureanalysator-Profil von ECA-Hydrolysaten dar. Wie der Vergleich mit den Elutionsprofilen von ECA-Hydrolysaten in Abb. 44 ebenfalls zeigt, ist Oligo A ein wesentlicher Bestandteil dieser ECA-Hydrolysate.

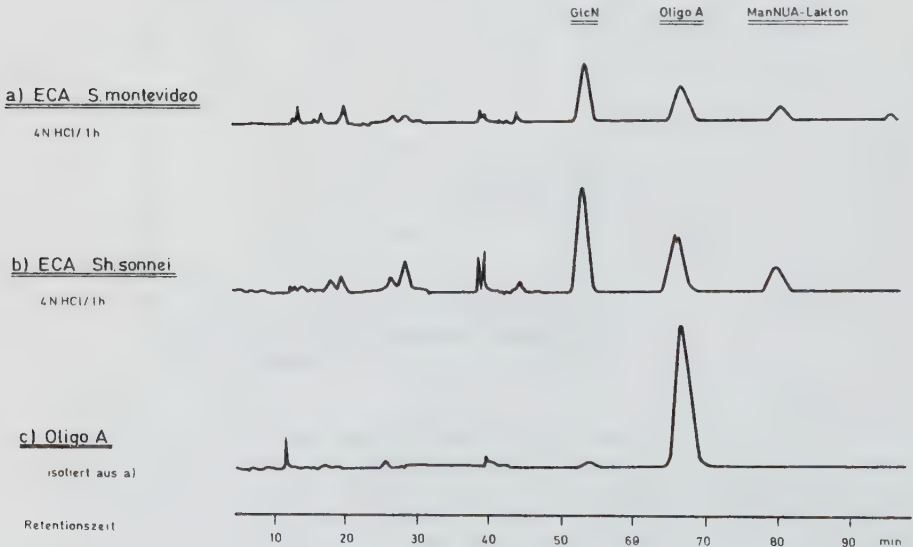


Abb. 44: Aus S. montevideo-ECA isoliertes Oligo A im Aminosäureanalysator. Vergleich mit den Elutionsprofilen von ECA-Hydrolysaten aus S. montevideo und Sh. sonnei

P2-Programm; je 33 µg

V.5.2. Untersuchungen zur Struktur von Oligo A

V.5.2.1. Hydrolysekinetik von Oligo A

Gleiche Mengen Oligo A wurden mit 4 N HCl 1, 4, 8 und 18 Stunden bei 100°C hydrolysiert und die getrockneten Hydrolysate im Aminosäureanalysator untersucht. Abb. 45 zeigt die Hydrolysekinetik von Oligo A. Mit zunehmender Hydrolysendauer ist eine Abnahme des Oligo A-Peaks bei gleichzeitiger Zunahme von GlcN, ManNUA-Lakton und ManNUA zu beobachten (die ManNUA und deren Lakton nehmen wegen der Säurelabilität bei längerer Hydrolyse wieder ab. Das isolierte Oligo A besteht also aus GlcN und ManNUA. Ein direkter Vergleich der Anteile dieser beiden Komponenten war aus den bereits erörterten Schwierigkeiten bei der ManNUA-Bestimmung nicht möglich. Doch zeigte sich beim Vergleich der Peakflächen nach verschiedenen Hydrolysezeiten, daß bei Halbierung der Oligo A-Menge (z.B. 19.88 zu 10.48nM) die GlcN-Menge um die Hälfte zunimmt (z.B. 4.25 zu 6.84). Dies kann als Hinweis für ein 1:1-Verhältnis von GlcN und ManNUA gesehen werden.

V.5.2.2. Methylierungsanalyse von Oligo A

Um die Verknüpfung der Zucker zu erhalten, wurde Oligo A methyliert. Oligo A wurde zur Blockierung der Aminogruppen N-acetyliert (E.4.8.5.) und anschließend bei 56°C vier Stunden mit NaBD₄ reduziert (E.4.8.3.). Durch Verwendung von NaBD₄ zur Reduktion läßt sich die C1-Stellung des reduzierenden Zuckers markieren. Das Material wurde methyliert (E.4.8.1.) und nach Reinigung auf einer

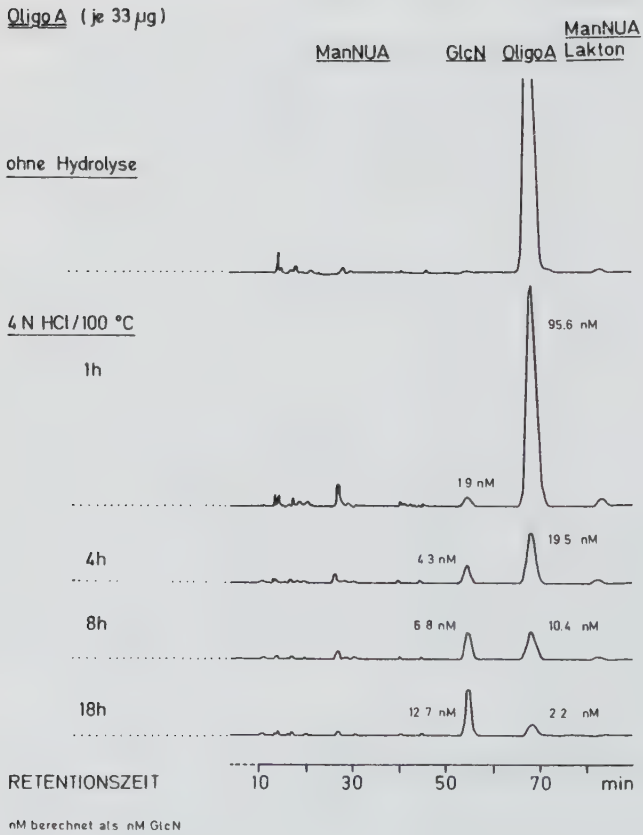


Abb. 45: Hydrolysekinetik von Oligo A
(Aminosäureanalysator)

P2-Programm

Sephadex LH 20-Säule durch kombinierte GC/MS-Analyse untersucht. Abb. 46 zeigt das Massenspektrum des permethylierten, reduzierten Oligo A sowie das zugehörige Fragmentierungsschema.

Die Methylierungsanalyse bestätigte das 1:1-Verhältnis der beiden Aminozucker: Oligo A ist also ein Disaccharid aus ManNUA und GlcN. Durch die erhaltenen Fragmente (z.B. m/e 277 und m/e 89) der permethylierten, reduzierten Substanz ließ sich GlcN als reduzierendes Ende des Disaccharides identifizieren (siehe Fragmentierungsschema). Die Bindung zwischen den beiden Zuckern konnte aufgrund der Fragmente m/e 89 und m/e 175 als 1→4-Bindung erkannt werden. Die Frage, ob es sich dabei um eine α- oder β-Bindung handelt, läßt sich durch Methylierungsanalyse nicht klären.

V.5.2.3. Protonenresonanz-Spektroskopie (PMR) von Oligo A

Für die PMR-Spektroskopie wurden 5 mg Oligo A in D₂O gelöst und lyophilisiert. Lösen in D₂O und Lyophilisation wurden noch zweimal wiederholt (H→D-Austausch). Das PMR-Spektrum (50°C; 300 MHz) der Substanz wurde von Herrn Prof. Friebolin, Heidelberg, aufgenommen. Für Oligo A wurden ein α- und ein β-Signal im Verhältnis 1.5 : 0.5 erhalten, was für eine α-Bindung im Disaccharid spricht.

Eine Messung der optischen Rotation des Polymers ergab für ECA

$$[\alpha]_{589}^{21.5^{\circ}} = +77.4^{\circ}$$

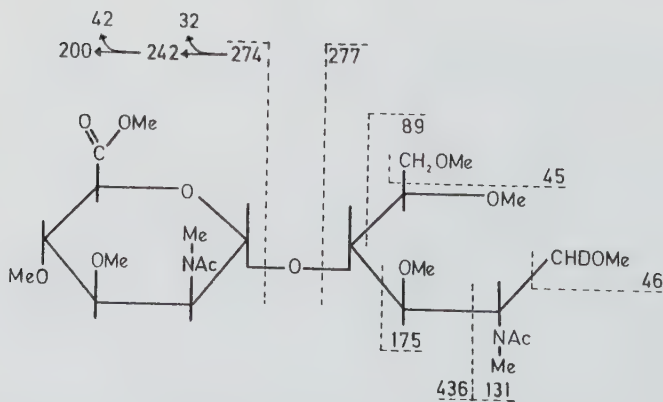
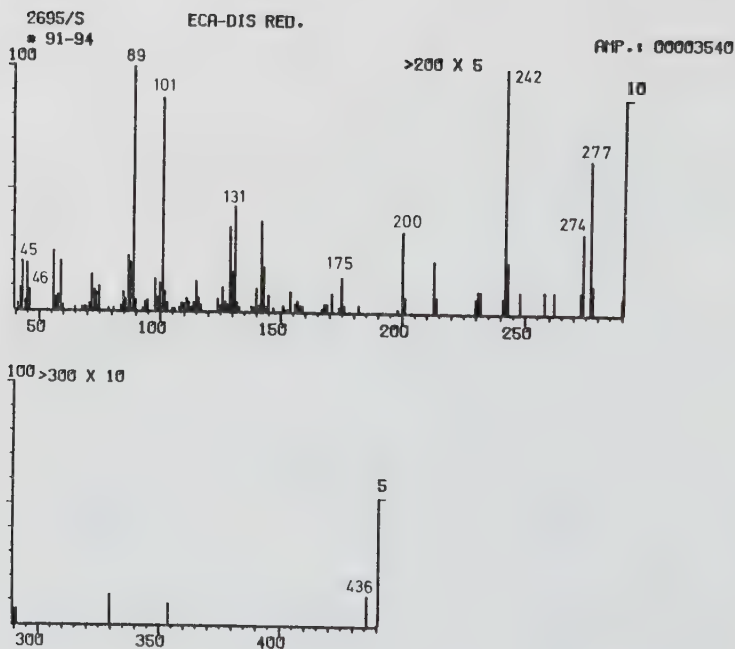


Abb. 46: Massenspektrum von reduziertem, permethyliertem Oligo A

GC/MS: cpTM-Sil 5-Säule; 70 eV; 250°C isotherm

Dies spricht für ein Überwiegen von α -Bindungen im Polymer; die für Oligo A ermittelte α -Bindung fügt sich somit gut in das Ergebnis der Rotationsmessung ein.

V.6. Zusammenfassung

Die Untersuchung von Partialhydrolysaten von ECA, das aus verschiedenen Stämmen und nach unterschiedlichen Extraktionsverfahren gewonnen worden war, im Aminosäureanalysator, ergab ein für ECA typisches Elutionsprofil mit den Komponenten GlcN, ManNUA-GlcN-Disaccharid und ManNUA-Lakton. Anhand dieses Profils kann das Vorliegen von ECA in Extrakten schnell überprüft werden.

Methylierungsanalysen des carboxyl-reduzierten ECA von S. monteideo SH94 und Sh. sonnei zeigten neben den bereits früher beschriebenen 3.6-di-O-methyl-Hexosaminitolacetaten das Vorliegen eines 3-mono-O-methyl-glucosaminitolacetates in beiden Präparaten. Die Möglichkeit des Auftretens dieses Zuckers aufgrund einer Untermethylierung muß noch überprüft werden, ist aber unwahrscheinlich. Der Nachweis dieses Zuckers ist ein Indiz für Verzweigungspunkte in der Kette oder Substitution von kettenständigem GlcNAc mit einer noch nicht identifizierten Komponente. Ein Zucker, der endständige Komponente einer Seitenkette sein könnte, wurde bei der Methylierungsanalyse nicht gefunden.

Im Aminosäureanalysator zeigte das reduzierte ECA einen höheren Gehalt an ManN als an GlcN, was dem von Männel und Mayer beschriebenen 1:1 Verhältnis von ManNACUA und

GlcNAc im Polymer widerspricht. Ein Ende der Zuckerkette ließ sich nicht identifizieren: möglicherweise ist dieses mit dem im Zuckerpolymer enthaltenen Glycerin substituiert.

Die hier erhaltenen Ergebnisse (mehr ManNAcUA als GlcNAc; vermutlich Verzweigung in der Kette) lassen sich nicht mehr mit einem linearen Aminozyuckerpolymer aus alternierenden Einheiten von GlcNAc und ManNAcUA in Einklang bringen. Auch die von Żugowski durchgeführte ^{13}C -NMR-Spektroskopie von ECA mit vier Signalen anomerer C-Atome im Verhältnis 1:2:1:1 spricht gegen ein Disaccharid als "repeating unit" des Aminozyuckerpolymers.

Aus Partialhydrolysaten von ECA wurde ein Oligosaccharid isoliert, das -wie dem Elutionsprofil von ECA im Aminosäureanalysator zu entnehmen ist- einen wesentlichen Bestandteil von ECA-Hydrolysaten darstellt.

Abb. 47 gibt einen Überblick über die an Oligo A durchgeführten Untersuchungen und die daraus abgeleitete Struktur.

Oligo A hat also die Struktur einer aus Aminozyuckern gebildeten Aldobiuronsäure, worauf die ausgeprägte Säurestabilität zurückzuführen ist.

Ein weiteres Oligosaccharid aus ECA wird zur Zeit in unserem Labor untersucht; die Untersuchung solcher Teilstrukturen soll zur Aufklärung der Struktur des Polymeren beitragen.

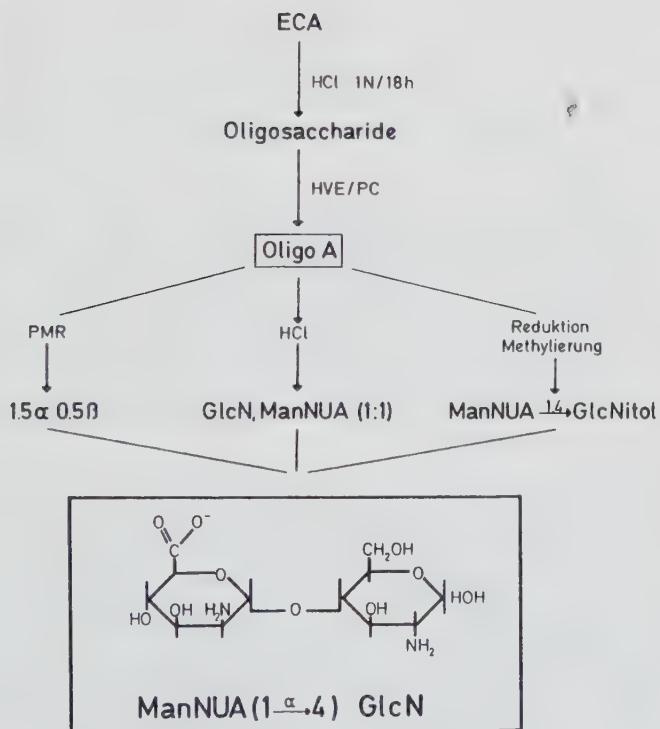


Abb. 47: Identifizierung von Oligo A

D. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

Isoliertes und gereinigtes ECA zeigt in der Immunelektrophorese auch bei Verwendung monospezifischer ECA-Antisera eine charakteristische "Vogelschwingen"-Präzipitation. Ähnliche Präzipitationsmuster wurden auch für Lipoteichonsäuren und einige K-Antigene aus E.coli-Stämmen beschrieben.

Dieses Präzipitationsmuster konnte durch Einwirkung von Detergentien zu einem einheitlichen Einzelbogen modifiziert werden: das "Vogelschwingen"-Muster ließ sich somit auf das Vorliegen eines Monomer/Micell-Gemisches zurückführen. Die Micellbildung amphiphatischer Moleküle ist konzentrationsabhängig. Die für ECA ermittelte kritische Micellenkonzentration liegt im Bereich handelsüblicher Detergentien (117).

Wird ECA aus lyophilisierten Zellen unter sehr schonenden Bedingungen (physiologische Kochsalzlösung, niedrige Temperatur) gewonnen, liegt seine Konzentration in den Extrakten unterhalb der kritischen Micellenkonzentration. Als Folge davon läßt sich nur ein einzelner, dem Monomer entsprechender Präzipitationsbogen beobachten. Wurden solche Extrakte nach Konzentrierung eingesetzt, trat wieder der charakteristische Doppelbogen auf.

Die Größe von LPS-Aggregaten läßt sich durch Entzug von Ca^{++} reduzieren (107). Dies spricht dafür, daß neben hydrophoben Kräften auch Vernetzung über mehrwertige Metallionen eintritt. Eine Bestimmung des Ionengehaltes von LPS und ECA aus der gleichen Anzucht von S. montevideo SH94 erbrachte Werte von $10.7 \mu\text{g Ca}^{++}/\text{mg ECA}$

gegenüber $4.8 \mu\text{g Ca}^{++}/\text{mg LPS}$. Inwieweit Ca^{++} -Ionen zur Aggregatbildung von ECA beitragen oder an der Assoziation von ECA mit anderen Komponenten in der Zellwand beteiligt sind, ist noch nicht bekannt. Zwar läßt sich ECA ebenso wie LPS (65) durch EDTA aus der Bakterienzellwand extrahieren; da jedoch ECA auch ohne EDTA leicht von den Zellen abgelöst werden kann, ist die Bedeutung von EDTA bei der ECA-Freisetzung noch nicht klar.

Bei Auftrennung von PW/PCP-extrahiertem ECA durch Gel-permeationschromatographie konnte gezeigt werden, daß neben Monomer und Micelle auch geringe Mengen an deacyliertem ECA-Monomer vorliegen (etwa 1.5% des Gesamt-ECA). Das deacylierte Monomer läßt sich bei vorhandener Präzipitation durch den Verlust der Fähigkeit zur Erythrozyten-Sensibilisierung erkennen.

Es besteht die Möglichkeit, daß die deacylierten Monomere bei der Aufarbeitung der Zellen als Folge der Einwirkung zellwandständiger Phospholipasen (104; 106; 127) oder Phosphatidylglycerin-spezifischer Lipasen (121) entstanden sind. Eine vergleichende Analyse von ECA aus zwei genetisch verwandten E. coli K-12-Stämmen, von denen einer einen Defekt in der Detergenz-resistenten Phospholipase A hatte (pldA^- -Mutante), spricht gegen diese Möglichkeit: der Fettsäuregehalt der pldA^- -Mutante lag noch unter dem des pldA -positiven Stammes. Es ist daher anzunehmen, daß deacyliertes ECA auch normalerweise in der äußeren Membran auftritt. Bei Lipoteichonsäuren liegen sowohl die zelluläre als auch die extrazelluläre als Gemisch von acylierter und deacylierter Form vor. Dabei variieren die Anteile beider Formen je nach Stamm und Wachstumsphase (83).

Bei Streptococcus faecalis konnte die Überführung der acylierten in die deacylierte Form durch eine membran-gebundene Deacylase nachgewiesen werden (60).

Bei einigen ECA-Antiseren tritt neben der Präzipitation in Form des "Vogelschwingen"-Musters eine zusätzliche, parallel-verlaufende Präzipitationslinie auf (Abb. 3; 80), deren Ausbildung nichts mit dem Monomer/Micell-Gleichgewicht zu tun hat. Da diese Linie auch nach Absorption der Seren mit ECA-negativen rfe⁻- und rff⁻-Mutanten erhalten bleibt, ist sie als Teilkomponente der serologischen ECA-Spezifität zu werten. ECA enthält eine geringe Menge an O-Acetyl (1.3 - 3.6%), über dessen Lokalisierung im ECA-Molekül noch nichts bekannt ist. Da TCA-extrahiertes ECA, das Erythrozyten nicht mehr sensibilisieren kann, dennoch O-Acetyl enthält, kann angenommen werden, daß der Zuckerstrang von ECA Träger der O-Acetylgruppen ist. Szweczyk und Taylor konnten kürzlich nachweisen, daß das Vi-Antigen von S. typhi, das dem ECA strukturell nahesteht, bei Immunisierung von Kaninchen Antikörper mehrerer Spezifitäten hervorbringen kann (147). Eine Spezifität ist gegen den N-Acetyl-D-galaktosaminuronsäure-Strang gerichtet, während die zweite Antikörpergruppe gegen O-Acetylgruppen gerichtet ist. Die zweite Antikörpergruppe ist relativ unspezifisch; selbst acylierte Polygalacturonsäure kann als Inhibitor für diese Vi-Spezifität eingesetzt werden. Bei verschiedenen Seren variieren die gegen diese beiden Determinanten gerichteten Antikörperquoten ganz beträchtlich. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die bei manchen ECA-Seren beobachtete zweite Spezifität ebenfalls gegen O-Acetylgruppen ge-

richtet ist. Ob ECA mit den O-Acetyl-spezifischen Antikörpern in Vi-Seren reagieren kann, wird mit unseren Präparaten im Labor von Dr. Szweczyk, Danzig, zur Zeit geprüft.

Durch Einsatz eines monospezifischen ECA-Antiserums (mit ECA⁻-Mutante absorbiert) konnte gezeigt werden, daß das 1961 von Brodhage (13; 14) mit Harnstoff aus Enterobacteriaceae isolierte "C-Antigen" mit dem später von Kunin beschriebenen CA (= ECA) identisch ist.

Ein Vergleich von ECA aus vier verschiedenen Stämmen -S. montevideo SH94; E. coli K-12 (CE1162) und dessen pldA⁻-Mutante (CE1163) sowie E. coli F470 (ECA-immunogener Stamm)- zeigte, daß bei identischer Antigenität und bei gleicher Zuckerzusammensetzung, auch Fettsäuregehalt und -zusammensetzung im wesentlichen ähnlich oder sogar identisch sind. Hauptfettsäure ist C16:0, daneben treten unter anderem auch zwei ungesättigte Fettsäuren -C16:1 und C18:1- auf. Massenspektrometrisch wurde festgestellt, daß diese nicht -wie von D. Männel für C16:1 beschrieben- als Δ^2 -ungesättigte Fettsäuren vorliegen; diese können bei der LPS-Analyse durch Wasserabspaltung stets aus den entsprechenden β -OH-Fettsäuren entstehen. Vermutlich handelt es sich um Δ^9 -ungesättigte Fettsäuren, die in Phospholipiden häufig anzutreffen sind. Nur im Fall von ECA aus dem ECA-immunogenen Stamm F470 wurde mit 6.5% ein höherer Fettsäuregehalt bestimmt. Die qualitative gaschromatographische Analyse zeigte einen beträchtlichen Gehalt an β -C14-OH, was auf eine Verunreinigung der Präparation mit LPS hinweist. Die Ausbeute an ECA aus diesem immunogenen Stamm war beträchtlich geringer als die aus den nicht-immunogenen Stämmen.

Die von Rinno et al. (119) beschriebene Lokalisierung von ECA in der äußeren Membran, stellt die Frage nach der Verankerung in dieser Membran. Durch Behandlung mit Flußsäure gelang es, den Lipidanker von ECA abzuspalten und seine Struktur mittels Massenspektrometrie als Phosphodiglycerid mit den Fettsäuren C16:0 in Position C1 und C16:1 in Position C2 zu identifizieren. Nach Abspaltung des Lipidteils lassen sich im degradierten ECA nur noch 0.07% Fettsäuren nachweisen, obwohl C16 und C16:1 nur etwa 60% des Gesamtfettsäuregehaltes von ECA ausmachen. Bei der beschriebenen Struktur des Lipidteils sollte zudem ein Molverhältnis der beiden Fettsäuren von 1:1 auftreten, tatsächlich enthält ECA mehr als doppelt soviel C16 wie C16:1. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen des Lipidteils sprechen dafür, daß die C2-Position auch mit C16:0, C18:0 und C18:1 besetzt werden kann, während die Substitution der C1-Stellung auf C16:0 beschränkt ist (Phospholipase A₂-behandeltes ECA enthält nur C16:0). Eine Variabilität der Fettsäuresubstituenten ist nicht außergewöhnlich; natürlich vorkommende Phosphoglyceride (z.B. Lecithin) sind zumeist Gemische aus Phosphoglyceriden mit verschiedenen Fettsäuresubstituenten.

Ein gleichstrukturierter Lipidteil wurde auch bei E. coli K-12 und 08⁻:K27⁻ (F470) nachgewiesen. Dabei ist bemerkenswert, daß auch bei dem ECA-immunogenen Stamm F470 ein Lipidanker gefunden wurde, da dieser Stamm auch das LPS-gebundene ECA enthält (62). Ob auch LPS-gebundenes ECA den Lipidanker enthält oder ob bei diesem Stamm das Aminozyuckerpolymer alternativ an Lipidanker oder den kompletten (LPS-) R-core gebunden vorliegen kann, ist noch nicht untersucht.

Der Nachweis eines separaten Lipidteils im ECA läßt erkennen, daß die bisherige Klassifizierung von ECA als "partiell acyliertes Aminosucker-Heteropolymer" nicht zutreffend ist. Der Lipid-Nomenklatur von Shaw folgend, wird jedes Zucker und Phosphat enthaltende Lipid als Glycophospholipid bezeichnet (135). Innerhalb der Gruppe bakterieller Glycophospholipide finden sich neben Glycerin-freien Substanzen (z.B. Lipid A) eine Vielzahl von Phosphoglycerid-enthaltenden Glycophospholipiden [z.B. die Lipoteichonsäure aus Streptococcus faecalis (169) oder die Phosphatidylinosit-Mannoside der Corynebakterien (135)]. ECA entspricht -ob an den Lipidanker oder den (LPS-) R-core gebunden- den Kriterien der o.a. Definition von Shaw. Um den amphiphatischen Charakter von ECA hervorzuheben, sollte ECA als Glycophospholipid bezeichnet werden.

Die bisher noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen zur Bindungsstelle von Lipid- und Zuckerteil durch Markierung mit CD₃J nach vorheriger Permethylierung und Flußsäure-Spaltung, weisen auf eine Bindung des Phosphoglycerides an C4 eines terminalen GlcNAc hin. Das Molekulargewicht des alkalisierten ECA von 2700 entspricht etwa 8-10 Zuckermolekülen im Polymer (79). Das hier ermittelte 1:3-Verhältnis von Bindungs- zu kettenständigem GlcNAc liegt somit -unter Berücksichtigung der hier nicht erfaßten ManNAcUA- etwa im erwarteten Bereich eines Bindungszuckers (und damit eines Lipidankers) pro ECA-Molekül.

Ein reduzierendes Ende von ECA konnte bisher weder durch Kopplung mit einer fluoreszierenden Komponente nach Hase (38; 39) noch durch Methylierungsanalyse nachgewiesen werden. Es war daher überraschend, daß der Lipidteil -als möglicher Substituent des reduzierenden Endes- am nicht-reduzierenden Ende des ECA gebunden ist. Da aber auch das Lipidanker-freie ECA immer noch Glycerin enthält, wäre eine Substitution des reduzierenden Endes mit Glycerin vorstellbar. Dies kann durch Methylierungsanalyse aber nicht nachgewiesen werden, da eine Markierung an C-1 im Verlauf der Säurehydrolyse abgespalten würde. Versuche mit radioaktiv-markiertem Glycerin und der Einsatz Glycerin-auxotropher Mutanten sind deshalb vorgesehen.

Eine beidseitige Substitution der Zuckerkette von ECA mit dem Phosphoglycerid bzw. Glycerin stände auch im Einklang mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse von carboxyl-reduziertem ECA, bei der keinerlei terminal-ständiger Zucker nachgewiesen werden konnte. Von anderen bakteriellen Glycolipiden sind ähnliche Substitutionen von reduzierendem und nicht-reduzierendem Ende der Zuckerkette bekannt, z.B. bei dem Glycerylphosphoryl-diglucosyl-Diglycerid von Streptococcus faecalis (135). Für die O-Ketten von S. monteideo hat Gmeiner eine Substitution des reduzierenden Endes mit Glycerinaldehydphosphat beschrieben (32). Bei S. monteideo und einigen E. coli-Serotypen ist sowohl die Biosynthese der O-Ketten als auch die des ECA vom ily-benachbarten rfe-Genort abhängig. Das Genprodukt von rfe ist allerdings immer noch unbekannt, es wird jedoch die Steuerung der Synthese oder die Modifizierung eines dem Bactoprenol entsprechenden Lipids vermutet (77).

Durch serologische Techniken (Gelpräzipitation) konnte gezeigt werden, daß die ECA-Antigenität durch chemische oder enzymatische Modifizierung des Lipidteils nicht nachweisbar beeinflußt wird. Hingegen wird die Affinität von ECA zu Zelloberflächen selbst bei Abspaltung von nur einer Fettsäure (Phospholipase A₂) vollständig zerstört. Dies weist auf die Bedeutung des Lipidteils für die physiko-chemischen und sicherlich auch biologischen Eigenschaften des ECA hin. Bei Lipoteichonsäuren konnte gezeigt werden, daß autolytische bakterielle Enzyme durch die acylierte, nicht aber durch die deacylierte Form gehemmt werden. Ob ECA bei gram-negativen Bakterien den Lipoteichonsäuren vergleichbar als Autolysinhemmer wirkt, wird augenblicklich in Zusammenarbeit mit Dr. Leduc in Paris untersucht. Die Bedeutung des hydrophoben Teils amphipatischer Moleküle der Bakterienzellwand wurde kürzlich umfassend dargestellt (169).

Versuche mit dem von Whang und Neter (160) entdeckten Pseudomonas-fluid-factor, der aus Kulturüberständen von Pseudomonas aeruginosa isoliert werden kann, zeigten, daß auch die Wirkung dieses Faktors nur die Zellaffinität, nicht aber die Antigenität von ECA zerstört. Der PF-Faktor konnte in ergänzenden Versuchen als (unspezifische) Esterase oder Esterasengemisch charakterisiert werden.

Nach dem von Männel und Mayer (79) gegebenen Strukturvorschlag für den Zuckerteil von ECA, besteht dieser aus einem linearen Strang alternierender Einheiten von GlcNAc und ManNAcUA. Dieser Strukturvorschlag basiert auf einer Methylierungsanalyse des carboxyl-reduzierten ECA und

massenspektrometrischem Nachweis von 3.6-di-O-methyl-2-N-methylacetamido-D-glucose und -D-mannose. Während Männel und Mayer nach Reduktion von ManNUA zu ManN ein Verhältnis von GlcN zu ManN = 1:1 ermittelten, beschrieben Ługowski und Romanowska für ihr aus Sh. sonnei isoliertes Produkt ein 1:2-Verhältnis der beiden Aminos Zucker (70). Es war daher die Möglichkeit zu prüfen, daß ECA aus Salmonella trotz gleicher serologischer Spezifität mit dem ECA aus Shigella nicht identisch ist. Beim direkten Vergleich von exakt gleichbehandelten Partialhydrolysaten beider Präparate in Aminosäureanalysator, konnten identische Elutionsprofile erhalten werden. Dieses Elutionsprofil (bestehend aus GlcN, ManNUA-GlcN-Disaccharid und ManNUA-Lakton) trat ebenfalls bei den ECA-Hydrolysaten von E. coli K-12 und 08⁻:K27⁻ auf. Durch dieses charakteristische Profil, das ebenfalls in Hydrolysaten von Rohextrakten zu identifizieren ist, ist eine rasche und einfache Methodik gegeben, ECA in Bakterienextrakten nachzuweisen oder seinen Verbleib im Verlauf einer Reinigungsfolge zu überprüfen.

Wurden Hydrolysate von carboxyl-reduziertem ECA im Aminosäureanalysator untersucht, wurde stets etwas mehr Mannosamin als Glucosamin nachgewiesen. Da außerdem wegen nicht-vollständiger Reduktion und wegen der höheren Säurelabilität von Mannosamin gegenüber Glucosamin sicherlich der Mannosamin-Gehalt noch zu niedrig gemessen wird, kann ein 1:1-Verhältnis der beiden Aminos Zucker nicht vorliegen.

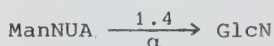
Bei einer Wiederholung der Methylierungsanalyse von carboxyl-reduziertem ECA unter Einsatz von Kapillarchromatographie mit neuen, temperatur-resistenten Säur-

lenfüllmaterialien (cpTM-SIL5), gelang es, neben den von Männel und Mayer (79) beschriebenen 3.6-di-O-methyl-2-N-methylacetamido-D-glucose und -mannose zusätzlich noch 3-O-methyl-2-N-methylacetamido-D-glucose nachzuweisen. Dieser Zucker trat auch bei Methylierung von nicht-reduziertem ECA sowie im reduzierten und nicht-reduzierten ECA aus Sh. sonnei auf. Es ist unwahrscheinlich, daß eine Untermethylierung vorliegt; da im allgemeinen die 6-Stellung am leichtesten methylierbar ist, wäre bei Untermethylierung eher mit 6-O-methyl-D-glucosamin zu rechnen. ECA muß daher entweder eine verzweigte Kette darstellen (mit bisher noch nicht identifiziertem terminal-ständigen Zucker) oder kettenständiges Glucosamin muß einen Alkali-stabilen (Nicht-Zucker-) Substituenten tragen. ¹³C-NMR gibt Hinweise auf eine Komponente mit einer CH₃-CH-Gruppierung, so daß die Möglichkeit besteht, daß eine bisher übersehene und durch Säurehydrolyse nicht unzersetzt freisetzbare Komponente diese Funktion übernimmt.

Diese Ergebnisse deuteten schon an, daß das von Männel und Mayer als "repeating unit" vorgeschlagene Disaccharid nur Teil der "repeating unit" sein kann. Erhärtet wurde dies durch die Überprüfung von ECA (S. monteideo und Sh. sonnei) durch ¹³C-NMR-Spektroskopie im Labor von Dr. Jennings, Canada: das Auftreten von vier Signalen anomerer C-Atome im Verhältnis 1:2:1:1 bedeutet, daß die "repeating unit" des ECA erheblich komplexer ist, als bisher angenommen.

Neben der Methylierungsanalyse der polymeren Substanz besteht die Möglichkeit der Strukturanalyse über die Aufklärung von Teilstrukturen.

Ein in Partialhydrolysaten von ECA auftretendes Oligosaccharid konnte durch Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie gereinigt werden und durch GC/MS-Analyse und PMR-Spektroskopie als Disaccharid der Struktur



identifiziert werden. Dieses Disaccharid stellt einen Teil der "repeating unit" von ECA dar. Es ist in Partialhydrolysaten wegen seiner Säurestabilität (Aldobiuronsäure-Typ) in hoher Ausbeute vorhanden, wie im Aminosäureanalysator nachweisbar ist (siehe Elutionsprofile von ECA-Partialhydrolysaten).

Ein zweites Oligosaccharid aus ECA-Hydrolysaten wird zur Zeit in unserem Labor untersucht.

Ein korrigierter Strukturvorschlag läßt sich im Augenblick nicht geben; weitere Untersuchungen von Oligosacchariden und Einsatz der β -Eliminierungstechnik zur Strukturaufklärung (67) sind noch abzuwarten.

Die Komplexierung von LPS mit dem basischen Protein Protamin wurde bereits 1958 von Neter et al. (97) beschrieben. Eine derartige Komplexierung wurde auch mit dem durch seinen hohen Anteil an N-Acetylmannosaminuronsäure stark negativ geladenen ECA getestet. Im Agar-Doppeldiffusionstest ließ sich ECA mit verschiedenen Proteinen präzipitieren. Der Protamin/ECA-Komplex zeigte

nach Trypsin-Verdauung des Proteins in der PHA keine Veränderung gegenüber der nicht-komplexierten Kontrolle, so daß davon ausgegangen werden kann, daß ECA bei der Komplexierung intakt bleibt. Die Komplexbildung mit Protamin läßt sich mit NaCl hemmen, was auf eine ionische Wechselwirkung als vorwiegende Ursache der Komplexierung schließen läßt. Aber auch über hydrophobe Interaktionen ist eine Komplexbildung von ECA und Protein möglich (Präzipitation nur mit methyliertem Albumin, nicht mit nativem). Die Bedeutung des hydrophoben Teils bei der Komplexierung von Lipoteichonsäuren mit Proteinen (z.B. autolytische Enzyme) wurde bereits erwähnt.

Bei der Untersuchung der Präzipitation mit Protaminsulfat zeigte sich, daß bei den als Kontrollen eingesetzten alkali-behandelten LPS-Proben nur die PCP-extrahierbaren aus R-Mutanten oder R-ähnlichen Wildtypen reagierten. Sollte sich dieses Ergebnis bei weiteren Untersuchungen mit einer größeren Zahl von LPS-Präparaten bestätigen, wäre damit eine einfache und schnelle Methode zur Unterscheidung von R- und S-Form LPS gegeben. Zudem läßt sich die Kombination von elektrophoretischer Auftrennung und Präzipitation mit Polykationen zur Überprüfung der Einheitlichkeit von LPS-Präparaten einsetzen.

Isoliertes und hochgereinigtes ECA ist im Kaninchen bei i.v.-Immunisierung nicht immunogen. Deshalb wurden bisher Immunisierungen zur Herstellung von ECA-Antiseren entweder mit ganzen Zellen ECA-immunogener Keime oder mit nicht gereinigten Rohfraktionen durchgeführt. Die so erhaltenen Seren wurden mit ECA-negativen Mutanten

absorbiert. Der Einsatz von ECA/Protamin-Komplexen als Immunogen führte erstmals auch mit gereinigtem ECA zu einer guten Immunantwort im Kaninchen. Es wurden Seren mit hohen Hämagglutinationstitern erhalten, von denen einige auch präzipitierten. Immunisierung mit dem ECA/meth. Albumin-Komplex führte ebenfalls zu einer Immunantwort gegen ECA, doch hatten die Seren niedrigere Titer. Hinweise auf eine Beeinflussung der ECA-Immunogenität durch die Anwesenheit von Protein als assoziierenden Partner hatten schon Versuche von Domingue und Johnson (22) gegeben. Die Immunogenität ihrer ECA-Rohfraktion wurde durch Erhitzen zerstört (ECA übersteht selbst 1-stündiges Autoklavieren bei 120°C).

Prof. E. Romanowska, Wrocław, konnte in Weiterführung unserer Experimente zeigen, daß eine isolierte und nicht-immunogene ECA-Präparation aus Sh. sonnei mit isolierten "Outer membrane"-Proteinen dieses Stammes assoziiert werden kann. Immunisierung mit diesen Komplexen führte ebenfalls zu einer guten Immunantwort (H.-M. Kuhn, G. Adamus, E. Romanowska, H. Mayer; Manuskript in Vorbereitung).

Auch bei Lipoteichonsäuren steht die Immunogenität der Präparationen in engem Zusammenhang mit dem Gehalt an assoziiertem Protein (167).

Aus der Tendenz der amphiphatischen Moleküle der Zelloberfläche zur Komplexbildung mit anderen Polymeren schließen Wicken und Knox (169), daß das Vorliegen gemischter Komplexe wohl eher dem natürlichen Zustand entspricht als gereinigte Präparate, und diskutieren, inwieweit die beobachteten biologischen Effekte auf derartige Mischkomplexe zurückzuführen sind.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang ein kürzlich durchgeführter Vergleich der biologischen Eigenschaften verschiedener ECA-Präparationen (P.J. Gannon, D.M. Jacobs, A. Marx, H. Mayer, E. Romanowska, E. Neter; in Vorbereitung): die Protein-freien Präparationen von Mayer und Romanowska waren nicht immunogen, nicht oder nur schwach mitogen und zeigten nur schwache polyklonale Aktivierung von B-Lymphozyten, während die noch 15% Protein enthaltende Präparation aus S. typhimurium von Marx, Bukarest, alle diese Eigenschaften sehr ausgeprägt besitzt.

Ausblick

Zur Familie der Enterobacteriaceae gehören eine Vielzahl krankheitserregender Keime. Die ursprüngliche Hoffnung, daß ECA-Antikörper einen wirksamen Schutz gegen enterobakterielle Infektionen darstellen könnten, haben sich nicht oder noch nicht bestätigen lassen. Allein gegen experimentelle Pyelonephritis im Kaninchen konnte bisher ein Schutz nachgewiesen werden (21).

Im Gegensatz zum Schutz durch ECA-Antikörper scheint der Nachweis von ECA-Antikörpern in menschlichen Seren erfolgversprechend. Für zukünftige Untersuchungen in dieser Richtung liefert eine kürzlich von Malkamäki (82) ausgearbeitete standardisierte Methode zum Nachweis von (IgM) ECA-Antikörpern eine gute Basis. Zwar besitzen die meisten gesunden Menschen geringe Mengen an ECA-Antikörpern, da zur Familie der Enterobacteriaceae sowohl Angehörige der normalen Darmflora als auch viele Infektionserreger gehören. Ein vierfach erhöhter Titer ist dagegen indikativ für eine Enterobacteriaceae-

Infektion (82). Insbesondere bei bakterieller Peritonitis, Shigellose und chronischer Pyelonephritis wurden signifikante Titeranstiege gemessen (18; 98; 99; 159). Bei der Untersuchung Pyelonephritis-erkrankter Kinder fanden Pump und Vertenyi (115) hingegen Titeranstiege bei akuter, nicht aber bei chronischer Pyelonephritis. Bei Patienten mit alkohol-bedingter Leberzirrhose wurden erhöhte ECA-Titer im Serum gemessen, nicht aber bei Patienten mit anderen Lebererkrankungen (Fettleber, chronische Hepatitis, Lebermetastasen). Das unterstreicht die Vermutung, daß gram-negative Bakterienkomponenten bei der Pathogenese alkohol-bedingter Leberzirrhose eine Rolle spielen (151).

Von besonderem Interesse ist der Nachweis von ECA-Antikörpern zur sero-diagnostischen Differenzierung: so ließen sich Brucella abortus- (kein ECA) und Yersinia enterocolitica- (ECA-positiv) Infektionen trotz kreuzreagierenden O-Antigens durch die Anwesenheit von ECA-Antikörpern bei Yersinia-Infektionen unterscheiden (93).

Diese Beispiele zeigen die diagnostische Bedeutung des Nachweises von ECA-Antikörpern.

E. MATERIAL UND METHODEN

1. Puffer

PBS: 8.00 g NaCl
 1.38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 0.31 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 0.20 g NaN_3
 1 l dest H_2O

 mit NaOH auf pH 7.4 einstellen

Tris: 10 mM Tris-HCl

 mit NaOH auf pH 7.5 einstellen

2. Bakterien

2.1. Kultivierung

Die Bakterien wurden nach dem Batch-Verfahren in Laborfermentern(14 l- bzw. 80 l-Ansätze) gezüchtet (129).

CH-Medium: 15.0 g Caseinpepton
 5.0 g Hefeextrakt
 3.0 g NaCl
 2.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$
 ad 1 l dest. H_2O

 4.0 g Glucose
 0.2 g MgSO_4

Temperatur: 37°C

pH: 7.2

Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Bakterien durch Phenolzusatz (1%) abgetötet und nach Waschen mit 0.9%iger NaCl-Lösung eingefroren.

Für die Absorption von Seren wurden die Bakterien nach 24 h Inkubation bei 37°C auf Petrischalen (14 cm Ø) mit 0.9%iger NaCl abgeschwemmt, eine Stunde auf 100°C erhitzt und mit 0.9%iger NaCl gewaschen.

Für die Gewinnung des PF-Faktors wurden die Bakterien auf Petrischalen (14 cm Ø) 72 h bei 37°C inkubiert und mit 0.9%iger NaCl abgeschwemmt.

2.2. Verwendete Bakterienstämme

siehe Tabelle nächste Seite

Stamm	Herkunft	Spezies/Serotyp	LPS/core	Mutation	ECA
F1756	P.H. Mäkelä (Helsinki)	<u>Salmonella</u> <u>montevideo</u> SH94	S	Wildtyp	+
F2387	E. Neter (Buffalo)	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> 014:K7	R/R4	<u>rfb</u> ⁻	imm.
F1327	Institutssamm- lung Freiburg*	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> 014:K7	R/R4	<u>rfe</u> ⁻	-
F470	Institutssamm- lung Freiburg*	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> 08 ⁻ :K27 ⁻	R/R1	<u>rfb</u> ⁻	imm.
20570	B. Lugtenberg (Utrecht)	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> K-12 CE1162	R/K-12		+
20571	B. Lugtenberg (Utrecht)	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> K-12 CE1163	R/K-12	<u>pldA</u> ⁻	+
	E. Romanowska (Wroclaw)	<u>Shigella sonnei</u> (Phase I)	S	Wildtyp	+
F4184	Institutssamm- lung Freiburg*	<u>Pseudomonas</u> <u>syncyanea</u>			-
F4187	Institutssamm- lung Freiburg*	<u>Pseudomonas</u> <u>trifolii</u> 0507			-
F4253	E. Neter (Buffalo)	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> Typ 4			-
	E. Neter (Buffalo)	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> Typ 6			-
	E. Neter (Buffalo)	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> Typ10			-

* Max-Planck-Institut für Immunbiologie

3. Extraktionsmethoden

3.1. PW/PCP-Extraktion (79)

Phenol-abgetötete Bakterien wurden zuerst nach dem Verfahren von Westphal et al. (157) mit 45% wässr. Phenol bei 68°C extrahiert. Die wässrige Phase wurde drei Tage gegen Wasser dialysiert und danach lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in PCP (2:5:8) aufgenommen und nach der Methode von Galanos et al. (28) weiterbehandelt. Nach Ausfällen von LPS aus der Phenolphase kann ECA nach ausgiebiger Dialyse mit anschließender Lyophilisation aus der Phenolphase gewonnen werden. Das Lyophilisat wird in Wasser 3%ig aufgenommen und vier Stunden bei 105000 x g zentrifugiert. Sofern nicht anders angegeben, wurde der Überstand (PL-L-Fraktion; siehe Abb. 2) verwendet.

3.2. Harnstoff-Extraktion (14)

1.5 g Bakterienlyophilisat wurden in 10 ml 0.9%iger NaCl aufgenommen und nach Zugabe von 2 g Harnstoff 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min/ 7000 x g) wurde der Überstand 48 h gegen PBS-Puffer dialysiert und lyophilisiert.

3.3. Isolierung des PF-Faktors (160)

Der Bewuchs einer Agarplatte (14 cm Ø) wurde nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C mit 25ml 0.9%iger NaCl abgeschwemmt und die Bakterien bei 7000 x g / 20 min

abzentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert (Millex 0.22 μm ; Millipore) und das bakterienfreie Filtrat bei -20°C aufbewahrt oder lyophilisiert.

4. Physikalisch-chemische Methoden

4.1. Chromatographische Methoden

4.1.1. Papierchromatographie (PC)

Papier: Whatman 1 für qualitatives Arbeiten
 Whatman 3 MM für präparatives Arbeiten

Trennsystem: Fischer/Nebel (25)

Atmosphäre: Pyridin/Essigsäureäthylester/Wasser
 11 : 40 : 6 (v/v/v)

Fließmittel: Pyridin/Essigsäureäthylester/Eisessig/
 5 : 5 : 1 :
 Wasser
 3 (v/v/v/v)
 im absteigenden System

Anfärbung: alkalische Silbernitrat-Lösung (150)

4.1.2. Hochspannungselektrophorese (HVE; 61)

Papier: Schleicher und Schüll 2043a für qualita-
 tives Arbeiten
 Schleicher und Schüll 2043b für präpara-
 tives Arbeiten

Elektrolyt: Pyridin/Ameisensäure/Essigsäure/
1 : 1.5 : 10 :
Wasser
90 (v/v/v/v)
pH 2.8

Spannung: 3000 V (45 V/cm)

Stromstärke: 50-100 mA

Temperatur: 2°-10°C

Laufzeit: 60-120 Minuten

Kühlung: Esso-Varsol (n-Heptan) über einen
Kältethermostaten

Anfärbung: alkalische Silbernitrat-Lösung (150)

Präparative HVE: Elution des Materials mit 0.01 N HCl.
Trocknung über NaOH im Vakuumexsikkator

4.1.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

Platten: DC Alufolie Cellulose 20x20
(Merck, Nr. 5552)
DC Alufolie Kieselgel 20x20
(Merck, Nr. 5553)

Laufmittel: 1 n-Butanol/Wasser 9:1; v/v (135)
2 CHCl₃/Methanol/Wasser 65:30:4; v/v/v
3 Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser
12:5:4; v/v/v
4 Fischer/Nebel (wie 4.1.1.)

Anfärbung: Joddampf
Benzidin/Na-meta-perjodat (137)
alkalische Silbernitrat-Lösung (150)

4.1.4. Gaschromatographie

Fettsäuren

Zu 2-3 mg Probe wurde Heptadecansäure (C17) in Benzol als innerer Standard pipettiert und das Benzol im Vakuumexsikkator abgedampft. Nach Zugabe von 0.5 ml 20%iger BF_3 /Methanol-Lösung (Merck) wurden die Gläschen unter Kühlung mit flüssigem N_2 zugeschmolzen und 6.5 Stunden im Trockenschrank bei 100°C belassen. Die Ampullen wurden unter Kühlung mit flüssigem N_2 geöffnet und 300 μl dest. H_2O hinzugegeben. Die Lösungen wurden fünf Mal mit 300 μl Petroläther ($40^\circ\text{--}60^\circ\text{C}$) extrahiert und die vereinigten Extrakte im Exsikkator getrocknet. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst und in den Gaschromatographen gespritzt.

Gerät: Perkin-Elmer Modell F20
Säule: Glassäule (0.3 x 150 cm) mit 2.5%
Castorwax auf Chromosorb G (80-100 mesh)
oder 15% EGSSX auf Chromosorb P (100-
120 mesh)
Trägergas: 25 ml Stickstoff/min
Schreiber: Hitachi Perkin-Elmer

4.1.5. Automatische Aminosäureanalyse

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Amino Zucker wurden die Elutionsprofile mit einem automatischen Aminosäureanalysator aufgenommen.

Gerät: Durrum D-500

Puffer:

	A	B1	B2
Na-Citrat x 2 H ₂ O	19.61g	19.61g	wie B1;
Thiodiglycol	5.00ml	5.00ml	aber durch
HCl konz.	12.31ml	8.37ml	Zusatz von
Phenol flüssig	1.00ml	1.00ml	NaCl 0.38M
H ₂ O ad	1000 ml	1000 ml	
Molarität	0.2 M	0.2 M	0.38 M
pH	3.29	4.25	4.25

Programm P2:	Puffer:	Zeit:
	A	0' - 28'
	B1	28' - 42'
	B2	42' - 100'

Temperatur: von 0' - 20' = 50°C

von 20' - 100' = 65°C

Messung: 590 nm

4.1.6. Gelchromatographie

Sephadex LH-20

Methyliertes ECA wurde auf einer Sephadex LH-20-Säule gereinigt.

Säule: 40 x 2 cm

Elutionsmittel: Äthanol/Chloroform (1:1 v/v)

Elutionsge-

schwindigkeit: 10 ml / h (absteigend)

Fraktions-

volumen: 100 Tropfen

Der Substanznachweis erfolgte mit Phenol/H₂SO₄ (E.4.3.2.)

oder visuell.

Oligo A wurde in gleicher Weise nach Methylierung auf einer 20 x 2 cm-Säule gereinigt mit Chloroform als Elutionsmittel.

Sepharose 6B

Auftrennung einer ECA-Lösung nach Molekülgröße erfolgte auf einer Sepharose 6B-Säule.

Säule: 41 x 2.6 cm

Elutionsmittel: 0.2 M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6.9
mit 0.01% NaN_3

Elutionsgeschwindigkeit: 10 ml/h (aufsteigend)

Fraktionsvolumen: 50 Tropfen

V_0 -Bestimmung: Dextran Blue 2000

Der Substratnachweis erfolgte nach E.4.3.2. b).

4.2. Nachweis- und spektrometrische Methoden

4.2.1. Anfärbungen

Alkalische Silbernitrat-Lösung (150)

Lösung I: 12.5 g AgNO_3 in 10 ml dest. H_2O lösen und zu einem Liter Aceton geben (eventuell Niederschlag mit Wasser in Lösung bringen)

Lösung II: 13 g KOH in 400 ml Methanol lösen

Lösung III: 5%ige wässrige Lösung von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Das getrocknete Chromatogramm wurde zweimal durch Lösung I gezogen und luftgetrocknet, dann zweimal durch Lösung II gezogen und im geöffneten Trockenschrank in Warmluft belassen, bis die gewünschte Farbintensität der Flecken erreicht war. Danach wurde in Lösung III fixiert und nach ausgiebigem Waschen in fließendem Wasser an der Luft getrocknet.

Jod:

Lipide auf getrockneten Dünnschichtplatten färben sich in einer mit Joddampf gesättigten Kammer braun. Die Färbung ist reversibel.

Benzidin/Na-meta-perjodat (137)

Säuren, Zucker und Zuckeralkohole lassen sich mit Benzidin/Na-meta-perjodat anfärben.

Lösung I: 0.1% Na-meta-perjodat in 80 ml
dest. H_2O

Lösung II: 2.8 g Benzidin in 80 ml 96%igem Äthanol lösen. Zugabe von 70 ml dest. H_2O ,
30 ml Aceton und 1.5 ml 1 N Salzsäure

Die getrocknete Dünnschichtplatte wurde mit Lösung I besprüht, danach wurde Lösung II auf das halbfeuchte Chromatogramm gesprüht und an der Luft getrocknet. Weiß/gelbe Flecken auf blauem Hintergrund (nicht haltbar).

4.2.2. Photometrische Bestimmungen

Absorptionsmessungen bei konstanter Wellenlänge

(280nm; 300nm; 530nm; 650nm)

Gerät: Zeiss Spektralphotometer PM Q 11

Temperatur: 21°C

Küvetten: Quarzküvetten 0.5 oder 1.0 ml

Absorptionsmessung bei veränderlicher Wellenlänge

(210-310nm)

Gerät: Spektralphotometer Cary Modell 118
Varian

Temperatur: 21°C

Küvetten: Quarz-Tandemküvetten mit 700µl/
Kompartiment

4.2.3. Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie (GC/MS)

Massenspektro-

meter: Finnigan Modell 3200E Quadrupol System

Datensystem: Finnigan Modell 6000

Gaschromatograph: Finnigan Modell 9500

Säule: cpTM-SIL 5 Glaskapillarsäule (Chrom-
pack) 25 m; Ø 0.5 mm; Filmdicke 0.4 µm

Trägergas: 4 ml Helium/min

Ionenquell-
temperatur: 50°C
Ionisations-
energie: 70 eV
Ionisationsstrom: 0.3 mA
ECA: 205°-250°C: 6°C/min
Oligo A: 250°C isotherm
Fettsäuren: 195°C isotherm; ab Spektrum 270:
10°/min
Lipid-Anker: Festkörper-Einlaß; langsames Aufheizen
bis 300°C

4.2.4. Polarimetrie

Gerät: Perkin-Elmer Polarimeter 141
Temperatur: 21.5°C
Küvette: Quarzglas-Küvette mit 0.999 dm Schicht-
dicke
Messung: 589nm (Na-D-Linie)
Probenlösung: 0.5 - 1%

Berechnung der spezifischen und molekularen Drehung

α = gemessener Drehwinkel
 c = Konzentration in g/100 ml
 d = Schichtdicke in dm
 T = Temperatur
 MW = Molekulargewicht

Spezifische Drehung:
$$[\alpha]_{589}^T = \frac{100 \times \alpha}{c \times d}$$

Molekulare Drehung:
$$[M]_{589}^T = \frac{[\alpha]_{589}^T \times MW}{100}$$

4.2.5. Atom-Absorptions-Spektrophotometrie

Lanthan-Lösung: 58.65 g La_2O_3 mit aqua dest befeuchten, 250 ml HCl konz. langsam hinzufügen und nach Auflösen von La_2O_3 mit aqua dest auf 1 l auffüllen.

Die Proben wurden in einen Kjeldahlkolben eingewogen und eine Glasperle, 1 ml HNO_3 konz. und 400 μl 70%ige Perchlorsäure hinzugegeben. Die Kolben wurden zum Sieden erhitzt und solange belassen, bis 0.5-0.8 ml Lösung in den Kolben enthalten waren. Die Proben wurden mit 3 x 2ml H_2O in 10ml-Kolben überführt, in denen sich 2 ml Lanthan-Lösung befanden: die Lanthan-Lösung verhindert Störungen durch Anionen bei der Messung. Mit aqua dest wurde auf 10 ml aufgefüllt. Parallel zu den Proben wurden Eichlösungen verschiedenen Ca^{++} - und Mg^{++} -Gehaltes behandelt.

Gerät: Perkin-Elmer Atom-Absorptions-Spektrophotometer 290B

Wellenlänge: 459 nm bei Ca^{++}
209.5 nm bei Mg^{++}

Strom Lichtquelle: 5 mA

Brenngas: 14.0 Skaleneinstellung

Luft: 14.0
Spalt: 7 Å

Nach Durchsaugen und Registrierung der Eichlösungen wurden die Probenlösungen durchgesaugt. Die Probenwerte Ca+Mg wurden auf der Eichkurve abgelesen und in µg/mg Substanz umgerechnet.

4.2.6. Bestimmung der kritischen Micellenkonzentration = cmc (117)

Die Bestimmung beruht auf der Inkorporation eines im UV-Bereich absorbierenden Chromophors in Micellen und der damit verbundenen Abnahme der Absorption. Eine Konzentrationsreihe von ECA in dest. H₂O im Bereich von 0.1 - 0.001% wurde angesetzt. In zwei Tandemküvetten wurden in je eine Kammer 0.6 ml 10⁻³ M wässr. Phenollösung (Chromophor), in die zweite Kammer 0.6 ml ECA-Lösung (c₀) eingefüllt. Die Messung der Absorption beider Küvetten gegeneinander bei 280 nm ergibt die Basislinie. Nach Ermittlung der Basislinie wurde eine der beiden Küvetten (= Probenküvette) mit Parafilm verschlossen und durch mehrfaches Umschütteln der Inhalt beider Kammern gemischt. Die Messung gegen die ungemischte Küvette (= Referenzküvette) ergibt das Differenzspektrum. Für c₀ << cmc weicht das Differenzspektrum nicht oder nur unerheblich von der Basislinie ab. Bei Erreichen und Überschreiten der cmc wird Phenol in Micellen eingebaut und die Differenz zur Basislinie nimmt zu. Wird die Differenzabsorption ΔA jedes Meßpaares gegen c₀/2 aufgetragen, zeigt sich an der cmc ein Knick in

der Kurve mit anschließendem linearen Anstieg. Die cmc wird als Schnittpunkt der Geraden durch den linearen Bereich mit der Konzentrationsachse definiert.

4.3. Analytisch-chemische Methoden

4.3.1. Hydrolysebedingungen

Zur Ermittlung der optimalen Hydrolysebedingungen wurden gleiche Substanzmengen mit 1 N oder 4 N HCl versetzt und in zugeschmolzenen Glasröhrchen bei 100°C unterschiedlich lang hydrolysiert. Nach Abkühlen der Röhrchen wurden diese geöffnet und die Proben über NaOH-Rotuli im Vakuumexsikkator getrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen. Wenn im Text nicht anders vermerkt, wurden die Proben mit 4 N HCl bei 100°C eine Stunde hydrolysiert.

4.3.2. Zuckerbestimmung

a) Nachweis mit Phenol/Schwefelsäure (23)

200 µl Lösung wurden mit 5 µl 80%igem Phenol und 0.5 ml H₂SO₄ konz. gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gelassen. Danach wurde 20 Minuten bei 60°C inkubiert und die Extinktion bei 490 nm gemessen. (Der Test wurde hier nur zum Substanznachweis, nicht zur Quantifizierung benutzt.)

b) Elson-Morgan-Reaktion für Aminozucker (120)

Lösung I: 1 ml Acetylaceton in 25 ml frisch
hergestellter 1 M Na_2CO_3 -Lösung
(Frisch zubereiten)

Lösung II: 0.8 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in
15 ml Äthanol und 15 ml HCl konz.

400 μl jeder Fraktion der Sepharose 6B-Säule wurden
hydrolysiert (4 N HCl/ 4 h 100°C) und 3 x über KOH
im Vakuumexsikkator getrocknet. Nach Aufnehmen der
Fraktionen in 250 μl dest. Wasser wurde nach Zugabe
von 0.5 ml Lösung I 20 Minuten bei 100°C inkubiert.
Zu den abgekühlten Proben wurden 1.5 ml Äthanol und
250 μl Lösung II gegeben und nach kräftigem Mixen
auf dem Whirlmix (CO_2 -Entfernung) weitere 10 Mi-
nuten bei 65°-70°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ab-
kühlen der Proben wurde sofort die Extinktion bei
530 nm gemessen. Es reagieren Aminozucker mit freier
1-Aldo-2-aminogruppe (Meßbereich: 5-150 μg).

4.3.3. O-Acetylbestimmung (27)

Die Probe wurde bei Raumtemperatur mit 0.05 N NaOH
3-4 Stunden hydrolysiert. Nachdem der pH auf 3-4 ein-
gestellt wurde, wurden 1-2 μl der Probe in den Gas-
chromatographen gespritzt. Als innerer Standard wurde
Propionsäure verwendet.

Gerät: Varian Gaschromatograph 1445-01

Säule: Porapack QS

Säulentemperatur: 200°C

Injektor-
temperatur: 170°C

Detektor-
temperatur: 240°C

Trägergas: 30 ml Stickstoff/min

Schreiber: Varian A25

Integrator: Varian Integrator 485

4.3.4. Bestimmung von Phospholipid (139)

Standard-Lösung: 27.03 g $\text{FeCl}_3 \cdot x \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
30.4 g NH_4SCN
1 l dest. H_2O

1 mg ECA wurde in 2 ml Chloroform gelöst und 2 ml Standardlösung hinzugegeben. Nach kräftigem Mixen auf einem Whirlmix und Separation der Phasen, wurde die optische Dichte der CHCl_3 -Phase bei 488 nm gemessen. Zur quantitativen Auswertung wurde eine Eichkurve mit DL-3-Lecithin hergestellt und der Probenwert abgelesen.

4.3.5. Formaldehydbestimmung (53)

Reagenz I: 0.4 M NaAsO_2

Reagenz II: 0.1 g Chromotropsäure (1.8 -di-hydroxynaphthal-3.6 -disulfonsäure)
10 ml dest. H_2O
auffüllen mit Mischung aus

15 ml H_2O /30 ml H_2SO_4 (0°C) auf
50 ml (in brauner Flasche 2-3 Wo-
chen haltbar)

Reaktionsansatz: 100 μl Probe aus Perjodatansatz
(E.4.12.)

5 μl 4 N HCl

20 μl Reagenz I

-

5-10 Minuten Zimmertemperatur

-

65 μl dest. H_2O

1 ml Reagenz II

-

30 Minuten 100°C

Extinktions-

messung: bei 570 nm

Kontrolle:

Nullwert mit H_2O

Standard mit 1.2-Dipalmitin (hydro-
lysiert)

4.4. Alkali-Behandlung

5 mg Substanz wurden in 0.5 ml dest. H_2O gelöst und
nach Zugabe von 1.6 ml 0.25 N NaOH 1 Stunde bei 56°C
belassen. Nach Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min
wurde der Überstand mit Eisessig auf pH 5 eingestellt
und 24 Stunden gegen Wasser dialysiert. Nach der Dia-
lyse wurden die Proben lyophilisiert und 0.1%ig in
dest. Wasser aufgenommen.

4.5. Laktonisierung der Mannosaminuronsäure (149)

5 mg ECA wurden in 4 ml Wasser gelöst und zur Entsalzung zwei Spatelspitzen frisch regeneriertes Dowex WX50 (H^+) zugegeben. Nach Mixen auf dem Whirlmix wurde das Dowex abzentrifugiert und der Überstand abgehebert. Der pH des Überstandes wurde mit 0.05 N NaOH auf 4.75 eingestellt und während der weiteren Behandlung am pH-Stat (TTT 60 Titrator; Radiometer Copenhagen) mit 0.1 N HCl konstant gehalten. 212 mg N-Cyclohexyl-N-[2-(4-morpholinyl)-äthyl]-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat (Fluka AG) wurden in wenig Wasser gelöst und tropfenweise zur Probe gegeben. Die Reaktionszeit beträgt 1-1 $\frac{1}{2}$ Stunden. Danach wurde bei konstantem pH reduziert.

4.6. Reduktion bei konstantem pH (149)

Zum Reaktionsgemisch von E.4.5. wurde als Schaumbremse 1 Tropfen n-Octanol gegeben. Danach wurden 10 ml wässrige 3 M NaBH₄-Lösung zugetropft. Die Reaktionszeit beträgt etwa 1-1 $\frac{1}{2}$ Stunden; während der Reaktion wurde der pH am pH-Stat mit 4 N HCl auf pH 7 gehalten. Die Proben wurden 24 Stunden gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Ein Teil der Probe wurde jeweils hydrolysiert und im Aminosäureanalysator die Effizienz der Behandlung überprüft. Laktonisierung (E.4.5.) und Reduktion wurden wiederholt (2-3 mal) bis keine Veränderung des Verhältnisses von GlcN und ManN mehr auftrat.

4.7. Kopplung des reduzierenden Endes von Zuckern mit einer fluoreszierenden Komponente (38; 39)

a) Präparation von Glc- und GlcN-Standard

80 mg D-Glucose (oder D-Glucosamin)
240 mg 2-Aminopyridin
40 mg Na-Cyanoborohydrid
8 µl Essigsäure konz.
1.28 ml Methanol

Das Gemisch wurde in einem Schliffreagenzglas über Nacht bei 37°C belassen. Nach der Inkubation wurde das Material über eine Kieselsäure-Säule gegeben.

Säule: Sila, 60-200 mesh (Sigma) in
Chloroform/Methanol/H₂O 10:8:2
(v/v/v)
1.5 x 30 cm

Elution: 500 ml H₂O (Waschvorgang)
500 ml CHCl₃/MeOH/H₂O = Elution des
Materials

Nach Konzentrierung am Rotationsverdampfer bei 30°C auf etwa 3-5 ml wurde über eine Dowex WX50-4 Säule weitergereinigt.

Säule: Dowex WX50-4 (H⁺)
1.0 x 5.0 cm

Elution: 500 ml H₂O (Waschvorgang)
1000 ml NH₃ (0.6 N) = Elution des
Materials

Das eluierte Material wurde am Rotationsverdampfer auf 1-2 ml eingengt.

b) Kopplung der ECA-Proben

Reagenz:	83 mg 2-Aminopyridin	
	32 mg Na-Cyanoborohydrid	Frisch
	37 µl Essigsäure konz.	zubereiten !
	330 µl Methanol	

2 mg ECA und 80 µl Reagenz wurden in einem zugschmolzenen Gläschen 7 Stunden bei 75°C inkubiert. Die abgekühlte Lösung wurde auf eine Dowex WX50-4 Säule gegeben.

Säule: Dowex WX50-4 (H^+)
1.0 x 2.0 cm

Elution: 10 ml H_2O (Waschvorgang)
200 ml NH_3 (0.6 N) = Elution des
Materials

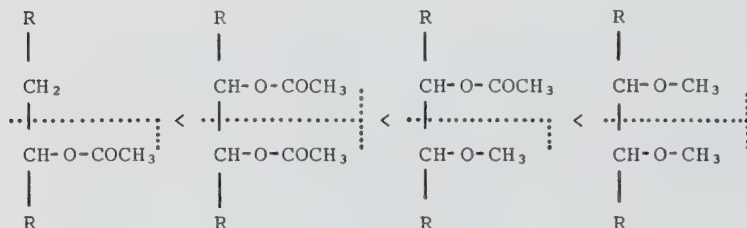
Am Rotationsverdampfer wurde das Eluat getrocknet und zur Entfernung von Borohydrid mehrmals in Methanol aufgenommen und getrocknet.

4.8. Methylierungsanalyse (6; 35)

Bei der Methylierung nach Hakomori (35) werden C-Atome mit freien Hydroxylgruppen sowie N-Acetylaminogruppen von ECA methylsubstituiert. Bei der anschließenden Hydrolyse entstehen aus dem methylierten Polysaccharid partiell methylierte Aldosen. Diese werden zu den Alditolen reduziert und mit Essigsäureanhydrid acetyliert.

Die partiell methylierten Alditolacetate sind flüchtig genug, um im Gaschromatographen getestet werden

zu können. Die gaschromatographisch aufgetrennten Alditolacetate werden massenspektrometrisch untersucht. Die Primärfragmente entstehen dabei durch Spaltung der C-C Bindung der Hauptkette, wobei die Tendenz zur Spaltung von der Substitution der C-Atome abhängt und in folgender Reihe zunimmt (6):



Sekundärfragmente werden aus den Primärfragmenten durch Eliminierung von Formaldehyd (MW: 30), Methanol (MW: 32), Essigsäure (MW: 60) und Keten (MW: 42) gebildet.

4.8.1. Methylierung

Dim syl-Na: In ein 100 ml-Serumglas wurden 20 ml Petroläther (40°-60°C) und 1.5 g NaH-Dispersion (50% in Öl; Roth) gegeben. Nach 15 Minuten Rühren wurde gewartet, bis das Hydrid sich abgesetzt hat, und das Lösungsmittel mit einer Pipette abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 20 ml trockenem Äthyläther wurde das Serumglas mit einer Bördelkappe mit Teflonbeschichtung (Machery-Nagel) mit einer Verschlußzange (Machery-Nagel) verschlossen. Durch die Kappe wurde eine Kanüle gesteckt und über

diese Verbindung das NaH an der Wasserstrahlpumpe 1 Stunde getrocknet. Das NaH mußte in Puderform vorliegen, ansonsten wurde der Waschvorgang wiederholt. Mit einer Spritze wurden 15 ml DMSO (p.A., 0.1% H₂O; Merck) in 1 ml-Portionen eingefüllt und das Reagenz bei 37°C mindestens 18 Stunden belassen. Der entstehende Überdruck wurde von Zeit zu Zeit durch Einstechen einer Kanüle abgelassen. Die Reaktion war beendet, wenn eine klare, braune Lösung vorlag. Das eingefrorene Reagenz ist 1-3 Monate stabil.

Die Substanzen wurden in einem 5 ml-Serumgläschen in einer Trockenpistole unter Vakuum bei 30°C über P₂O₅ 2 Tage getrocknet. Nach Entnahme des Gläschens wurde dieses sofort mit einer Bördelkappe verschlossen und nach Zugabe von 0.1-0.3 ml DMSO solange im Ultraschallbad beschallt, bis die Substanz vollständig gelöst war. Mit einer Spritze wurde Dimsyl-Na (2 Volumen von DMSO) zugegeben und erneut beschallt, bis eine klare Lösung entstanden war. Das Material wurde im Eis an den Wänden eingefroren und im Eisbad 2 ml Methyljodid (Merck) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde am Schüttler über Nacht kräftig geschüttelt. Nach Überführung des Materials in einen Spitzkolben wurde das Methyljodid am Rotationsverdampfer (30°C) abgezogen und der Rückstand in 10 ml Chloroform aufgenommen und mit 3 mal 10 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde am Rotationsverdampfer getrocknet, das Material in ca. 300 µl Äthanol/Chloroform 1:1 (v/v) aufgenommen und über eine Sephadex-LH 20-Säule (E.4.1.6.) fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit Phenol/Schwe-

felsäure (E.4.3.2.) getestet oder nach Eindampfen im siedenden Wasserbad am Röhrchenboden visuell identifiziert. Das Material wurde in wenig Aceton aufgenommen, die Fraktionen vereinigt und nach Ausfällen des Materials mit wenigen Tropfen Wasser im Vakuum-exsikkator getrocknet.

Deuteromethylierung: Wie Methylierung, nur C^2H_5J statt CH_3J .

4.8.2. Hydrolyse

Die methylierte Substanz wurde über Nacht in 0.3 ml 0.5 N H_2SO_4 /Essigsäure (95 ml Essigsäure und 5 ml 10 N H_2SO_4) bei $100^\circ C$ hydrolysiert und nach Zugabe von 0.3 ml Wasser noch 5 Stunden bei $80^\circ C$ belassen. Auf einer 1-cm-Säule ($\varnothing$ 1 cm) mit Amberlite IRA 410; CO_3 -Form (Serva) wurde mit Methanol als Elutionsmittel entsalzt und danach am Rotationsverdampfer getrocknet.

4.8.3. Reduktion

Mit $NaBH_4$

Die Proben wurden in 0.2 ml Wasser gelöst und eine Spatelspitze $NaBH_4$ (Merck) zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln belassen. Nach der Inkubation wurde überschüssiges Reduktionsmittel mit einigen Tropfen Essigsäure zerstört (bis ca. pH 6) und die Probe am Rotationsverdampfer getrocknet. Borsäure wurde durch 5maliges Aufnehmen in Methanol und Trocknen am Rotationsver-

dampfer entfernt.

Oligo A wurde bei 56°C für vier Stunden reduziert.

Mit NaBD₄

Die Proben wurden in 2.5 ml Deuteriumoxid (99.9%; Merck) aufgenommen und eine Spatelspitze NaBD₄ (Merck) zugegeben. Weitere Behandlung wie bei NaBH₄.

4.8.4. Acetylierung

Das Material wurde mit 0.3 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 2 Stunden bei 100°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.3 ml Toluol wurde die Lösung am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingengt und 0.7 ml Wasser zugegeben. Die methylierten, acetylierten Substanzen wurden daraus mit 3 x 1 ml Chloroform extrahiert und die Chloroformphase getrocknet.

4.8.5. N-Acetylierung

Zur Probe wurden 500 µl H₂O, 50 µl NaOH (10%) und 5 µl Essigsäureanhydrid gegeben, geschüttelt und drei Minuten bei Raumtemperatur belassen. Zweimal wurden zu dem Gemisch 50 µl NaOH (10%) und 5 µl Essigsäureanhydrid zugegeben und je drei Minuten inkubiert. Dann wurde der pH mit 6-7 µl Essigsäureanhydrid auf pH 7 gebracht und das Material nach Überführung in einen Schliffgrundkolben am Rotationsverdampfer bei 30°C getrocknet und zweimal mit Wasser gewaschen.

4.9. Dephosphorylierung mit Flußsäure

Bis zu 5 mg Substanz wurden in 0.5 ml 48%iger wässriger HF (pA.; Merck) in einem Polyäthylenröhrchen mit Schraubverschluß 48 Stunden bei 0°C belassen. Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und über KOH (wegen HF) lyophilisiert. Für die Lyophilisation wurde eine Ölpumpe D16A (Leybold-Heraeus) verwendet; der Teil der Apparatur, in dem sich die Probe befand, wurde mit Eis gekühlt, die Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff. Die Lyophilisation dauerte 6-8 Stunden. Danach wurde die Probe mit 3 x 1ml Wasser/1ml Chloroform in einen 100ml-Spitzkolben überführt und bei 30°C am Rotationsverdampfer das Chloroform entfernt. Die wässrige Lösung wurde nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff in einem handelsüblichen Gerät (ohne KOH) erneut lyophilisiert.

4.10. Lipidextraktion (7)

Einphasenlösung: Chloroform/Methanol/Wasser

1 : 2 : 0.8 (v/v/v)

Das Material wurde in 5 ml Einphasenlösung kräftig geschüttelt. Durch Zugabe von 5 ml Chloroform und 5 ml Wasser entsteht ein Zweiphasen-System (CHCl_3 :Methanol/Wasser 1 : 0.9). Nach kräftigem Schütteln und anschließender Phasentrennung wurde die Methanol/Wasser-Phase am Rotationsverdampfer getrocknet und mit diesem Material die Extraktion wiederholt. Die vereinigten Chloroform-Extrakte wurden am Rotationsverdampfer getrocknet: sie enthalten die Lipide.

4.11. Deuteroacetylierung

Chloroform-Extrakte (= org. Phase) der Lipidextraktion wurden in 0.3 ml (CD_3CO)₂O aufgenommen und bei 100°C für 2 Stunden belassen. Nach Zugabe von 0.3 ml Toluol wurde das Material am Rotationsverdampfer eingengt und die deuteroacetylierte Probe 2 mal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Extrakte wurden am Rotationsverdampfer getrocknet.

4.12. Perjodatoxidation (53)

Reaktionsansatz: 750 µl dest. H₂O
250 µl 0.025 M NaJO₄
100 µl 0.01 M Probenlösung

Im Dunkeln eine Stunde reagieren lassen.

Jede CH₂OH-Gruppe von Glycerin liefert ein Molekül Formaldehyd. Nachweis von Formaldehyd: E.4.3.5.

4.13. Ionenaustauscher-Säule

Oligo-A wurde auf einer Dowex WX50-2 Säule gereinigt.

Säule: 1 x 1 cm (2 ml-Einmalspritze; Dowex auf Glaswolle-Schicht geben und mit Glaswolle überschichten)

Das Dowex wurde vorher mit 4 N HCl regeneriert.

Elution: a) mit 30 ml dest. H₂O (Entfernung
 neutraler Bestandteile)
 b) mit 30 ml 0.5 N HCl (Oligo A)

Eluat b) wurde lyophilisiert.

5. Enzymbehandlungen und -nachweise

5.1. Phospholipase-Behandlung (84)

Enzyme: Phospholipase A₂ aus Schlangengift
 EC 3.1.1.4. (Boehringer, Nr. 108499;
 200 U/mg)
 Phospholipase A₂ aus Crotalus durissus
 EC 3.1.1.4. (Sigma, Nr. P-4263;
 180 U/mg Protein)

Ansatz: 0.5 mg Probe
 0.5 ml CaCl₂ 0.1%
 1.0 ml Tris-Puffer 0.1 M, pH 7.3
 0.1 ml FeCl₂ konz.
 0.02 mg Enzym

Inkubation: 72 Stunden bei 37°C

Nach der Inkubation wurde über Nacht gegen Wasser dialysiert und nach Lyophilisation 0.1%ig in dest. Wasser aufgenommen.

5.2. Lipase Behandlung

Enzym: Lipase aus Candida cylindraceae
 EC 3.1.1.3. (Sigma, Nr. 1-1754;
 2900 units/mg Protein)

Ansatz: 1 mg Probe
 3 mg Lipase
 1 ml Tris-Puffer 0.1 M, pH 7.7

Inkubation: 7 Tage bei 37°C

Der Ansatz wurde wegen der langen Inkubationszeit
vor der Inkubation sterilfiltriert (Millex 0.22 µm;
Millipore).

5.3.L-Aminosäure-Oxidase-Behandlung

Enzyme: L-Aminosäure-Oxidase aus Crotalus
 Adamantus EC 1.4.3.2. (Sigma
 A-9378; 4.8 units/mg Protein)
 Katalase aus Rinderleber EC 1.11.1.6.
 (Serva, Nr. 26900; 39000 EU/mg;
 20mg/ml)

Ansatz: 0.5 mg Probe
 0.2 ml Tris-Puffer 0.1 M, pH7.7
 25 µl Katalase
 20 µl LAO

Inkubation: 16 Stunden bei 37°C

Nach der Inkubation wurde der Ansatz 5 Minuten bei
100°C gehalten; das Enzym koaguliert und läßt sich
abzentrifugieren.

5.4. Esterase-Nachweis

5.4.1. Esterase-Färbung (15)

(Alles mit Handschuhen !)

Lösung I: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 7.5,
 1 mM CaCl_2

Lösung II: 2% α - und 2% β -Naphthylacetat in
 Aceton

Lösung III: Fast Red TR (5-chlor-O-toluidin)
 Eine volle Spatelspitze Fast Red
 in 10 ml I lösen und weitere 50 ml
 I hinzu sowie 600 μl von II

Die Proben wurden in die Auftragungslöcher von zwei Agarosegel-Objektträgern (siehe E.6.7.1.) eingefüllt und eine Stunde in der Elektrophorese-Kammer aufgetrennt (10 V/cm). Nach Trocknung wurde ein Objektträger mit Coomassie-Blue zur Lokalisierung des Materials angefärbt (E.6.8.).

In eine große Petrischale wurde etwas Puffer (I) gegossen, der zweite Objektträger hineingelegt und mit der Lösung III übergossen. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgegossen und 3 mal mit Wasser die Schale ausgespült. Dann wurde der Objektträger mit Wasser übergossen und 5 Minuten so belassen. Nach Absaugen und erneutem Abspülen mit Wasser wurde der Objektträger herausgenommen und getrocknet.

Esterase: rotbraune Färbung

5.4.2. Photometrischer Esterase-Nachweis (43)

Probe: 50 µg lyophilisierter PF-Faktor/µl
Wasser (Gewinnung von PF:
E.3.3.)

Ansatz: 1.8 ml Tris-Puffer 10mM, pH 7.5
1.0 ml Acetylsalicylsäure $1.5 \times 10^{-2} \text{M}$
0.2 ml Probe

Inkubation: nach Messung des Anfangswertes 72
Stunden bei 56°C

Messung: bei 300 nm

Nullwert: Testansatz ohne PF-Faktor. Nullwert
muß mitinkubiert werden, da es zur
spontanen Umwandlung von Acetyl-
salicylsäure zu Salicylsäure kom-
men kann.

5.5. Pseudomonas-fluid-factor (160)

Ansatz: 1 mg ECA
10 ml PF-Faktor (Gewinnung siehe
E.3.3.)

Inkubation: 72 Stunden bei 56°C

Anschließend wurde 24 Stunden gegen Wasser dialy-
siert.

6. Serologische Methoden

6.1. Immunisierung

Für die Immunisierungen wurden Weiße Neuseeländer-Kaninchen verwendet, die mindestens drei Monate alt waren. Die Kaninchen wurden im Abstand von vier Tagen dreimal i.v. (Ohrvene) immunisiert. Dabei wurden steigende Mengen Bakteriensuspension verwendet: 0.25 ml, 0.5 ml und 1.0 ml einer Suspension mit 10^{10} Zellen/ml physiologischer Kochsalzlösung.

Blutproben für die Bestimmung von Null- und Zwischentitern wurden durch Anritzen der Ohrvene entnommen.

Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet.

Um Antiseren gegen ECA herzustellen, wurde mit E. coli 014 F2387 immunisiert.

Bei Immunisierung mit ECA/Protein-Komplexen wurde entsprechend dem Schema auf der nächsten Seite immunisiert.

Immunisierungsschema: ECA/Protein-Komplexe

Serum-Nr.	Tag						Blutentnahme/Tag
	0	4	7	14	26	45	
ECA/Protaminsulfat (µg)							
1	20/ 10	20/ 10	100/ 50	100/ 50	-	-	18
2	20/ 20	20/ 20	100/100	100/ 100	-	-	18
3	20/ 40	20/ 40	100/200	100/ 200	-	-	18
4	20/ 60	20/ 60	100/300	100/ 300	-	-	18
5	20/ 80	20/ 80	100/400	100/ 400	-	-	18
6	20/ 20	20/ 20	100/100	100/ 100	2560/2560	-	31
7	20/ 20	20/ 20	100/100	100/ 100	240/ 240	2560/2560	50
8	40/ 40	40/ 40	200/200	200/ 200	2560/2560	-	31
9	20/ 20	20/ 20	100/100	100/ 100	1020/1020	2560/2560	50
10	160/160	800/800	800/800	800/ 800	2560/2560	-	31
11	- / 60	- / 60	- / 300	- / 300	-	-	18
12	20/ -	20/ -	100/ -	100/ -	-	-	18
ECA/meth. Albumin (µg)							
13	20/ 20	100/100	100/100	200/ 200	2000/2000	-	31
14	80/ 80	400/400	400/400	800/ 800	2000/2000	2000/2000	50
15	160/160	800/800	800/800	1600/1600	2000/2000	2000/ -	50

6.2. Herstellung von Antiseren

Das entnommene Blut wurde zur Koagulation eine Stunde bei 37°C gehalten und der Blutkuchen mit einem Kreuzschnitt geteilt. Nach Aufbewahrung über Nacht bei 4°C wurde das Serum durch Abzentrifugation (20 Minuten/ 5000 rpm) vom Blutkuchen getrennt. Zur Komplement-Zerstörung wurde das Serum 60 Minuten bei 56°C gehalten und anschließend bei -20°C gelagert.

6.3. Serumabsorption

Der Bakterienbewuchs von drei großen Petrischalen (Ø 14 cm) wurde mit 0.9%iger NaCl abgeschwemmt, die Suspension auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und 1 Stunde bei 100°C gehalten. Bei 10000 rpm wurden die Zellen abzentrifugiert und mit NaCl gewaschen.

1 ml Serum wurde zu den Zellen eines Röhrchens gegeben, gemischt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Durch Zentrifugation wurde das Serum von den Zellen getrennt und der Absorptionsvorgang mit den Zellen des zweiten Röhrchens wiederholt. Bei Immunisierung mit E. coli F2387 wurde zur Absorption die ECA⁻-Mutante F1327 eingesetzt.

6.4. Inaktivierung von IgM-Antikörpern (108)

Eine 0.01 M Dithiothreitol-Lösung in PBS, pH 7.4, wurde mit einem gleichen Volumen Serum gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Seren mit NaCl 0.9%ig auf die endgültige

Serumverdünnung (1:10 oder 1:40) gebracht und in der passiven Hämagglutination eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Teil des Serums nur mit PBS (ohne Dithiothreitol) vermischt und ansonsten in gleicher Weise behandelt.

6.5. Beladen von Erythrozyten mit Antigen

25 μ l 3mal gewaschener Humanerythrozyten (Blutgruppe A) wurden in 5 ml 0.9%iger NaCl aufgenommen und mit 100 μ l 0.1%iger Antigen-Lösung (oder Kulturüberständen) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Sensibilisierung wurden die Erythrozyten 3mal mit NaCl gewaschen, um überschüssiges Antigen zu entfernen. Die sensibilisierten, gewaschenen Erythrozyten wurden dann erneut in 5 ml NaCl aufgenommen.

6.6. Passive Hämagglutination (95)

HA-Puffer:	100 ml 0.9%ige NaCl
	23.9 ml KH_2PO_4 0.15 M
	76 ml Na_2HPO_4 0.15 M
	pH 7.2

In die Löcher einer Cook Microtiterplatte (V-Form) wurden 50 μ l HA-Puffer pipettiert und mit durch NaCl (0.9%) 1:10 (oder 1:40) verdünntem Antiserum eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 so hergestellt, daß sich in jedem Loch 50 μ l-Antiserumverdünnung befanden. Dazu wurden jeweils 50 μ l mit Antigen beladene Erythrozyten (D.6.5.) gegeben.

Als Kontrollen wurden

- a) 50 µl Puffer mit sensibilisierten Erythrozyten
- b) 50 µl verd. Antiserum mit nicht-sensibilisierten Erythrozyten

eingesetzt. Die Platten wurden zur Agglutination 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Hämagglutinationstiter wurde als reziproker Wert der Verdünnungsstufe abgelesen, bei der gerade noch komplette Hämagglutination auftritt.

6.7. Immunpräzipitation

6.7.1. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (112)

Hirschfeld-Puffer	1.7 g Diäthylbarbitursäure
für Gelplatten (42)	10.51 g Veronal-Na
	1.57 g Ca-Lactat
	1 l Wasser
	pH 8.6

0.9 g Agarose (Litex, Dänemark) wurden in 30 ml Puffer und 60 ml Wasser gelöst und auf entfettete Objektträger aufgetragen (ca. 12 ml/3 Objektträger). Nach Erstarren des Gels wurden Löcher mit einer Stanze (Gelman Instrument 51170-1) in die Agarose-Schicht gestanzt, Antigen-Lösungen und Antiseren in die Löcher gefüllt und 3-4 Tage bei 4°C in einer feuchten Kammer belassen.

6.7.2. Immunelektrophorese (128)

Hirschfeld-Puffer	3.5 g Diäthylbarbitursäure
für Kammer (42):	21.9 g Veronal-Na
	0.96 g Ca-Lactat
	0.5 g NaN_3
	2.5 l Wasser
	pH 8.6

Beschichtete Objektträger wurden wie unter E.6.7.1. beschrieben hergestellt und mit einer Stanze in der Mitte des Objektträgers in Längsrichtung eine Rinne und an deren einem Ende je ein Loch oberhalb und unterhalb der Rinne ausgestanzt. Die Löcher wurden mit Antigen-Lösung gefüllt und diese in einer Elektrophorese-Kammer (Camag) bei einer Feldstärke von 10V/cm ca. 60 Minuten aufgetrennt (Marker: Bromphenolblau). Danach wurde die Rinne ausgehoben und mit Antiserum gefüllt. Inkubation: 3-4 Tage in einer feuchten Kammer bei 4°C.

6.7.3. Fused-Rocket-Immunelektrophorese (146)

Puffer:	22.42 g Diäthylbarbitursäure
	44.3 g Tris
	0.54 g Ca-Lactat
	0.64 g NaN_3
	1 l Wasser
	pH 8.6
	Vor Gebrauch mit Wasser 1:5 verdünnen

Agarose A (Pharmacia) wurde 1%ig in Puffer gelöst und auf einer entfetteten Glasplatte (10x10 cm) nach Auflegen eines Glasstabes als Barriere ein ca. 3 cm breiter Agarose-Streifen gegossen. Nach Erkalten der Agarose wurde der Glasstab entfernt und der Streifen auf 2 cm Breite geschnitten. 12 ml Agarose (56°C) wurden mit 1.5 ml Antiserum vermischt und damit der Rest der Platte beschichtet. Nach Erstarren der Agarose wurden in den Serum-freien Streifen entsprechend der Zahl der zu testenden Fraktionen Löcher gestanzt und gleiche Volumina der Säulenfraktionen eingefüllt. Nach 30 Minuten Vordiffusion wurde die Platte in einer Kammer (LKB Biochrom 2117 Multiphor mit Power Supply 2103) bei 1.5 V/cm 14-17 Stunden laufen gelassen (Marker: Bromphenolblau). Die Platte wurde danach zur Entfernung überschüssigen Serums 5mal abwechselnd in 0.9%iger NaCl gewässert und zwischen Filterpapier (feucht) und Zellstoff gepresst. Nach Trocknen der Platte mit Warmluft wurde mit Coomassie-Blue gefärbt.

6.7.4. Crossed-Immunelektrophorese (155)

Puffer, Agarose und Geräte wie bei E.6.7.3. .
Eine entfettete Glasplatte (5x10 cm) wurde mit 11 ml Agarose-Lösung beschichtet und nach Erkalten an der Längsseite im 2 cm-Abstand Löcher gestanzt. Die Antigen-Lösungen wurden eingefüllt und 1-1¹/₂ Stunden bei 6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt (Marker: Bromphenolblau). Nach Beendigung der ersten Elektrophorese-Stufe wurden mit einer Klinge Gelstreifen mit den einzelnen Proben voneinander getrennt und jeweils ein

Streifen auf den unteren Rand einer neuen Glasplatte übertragen. Mit einer Mischung aus 5.3 ml Agarose (56°C) und 0.55 ml Antiserum wurde der Rest jeder Platte beschichtet und die Platte in der zweiten Dimension erneut in die Kammer gebracht (1.5 V/cm für 14-17 Stunden). Weitere Behandlung wie bei der Fused-Rocket-IE.

6.7.5. Rocket-Immunelektrophorese (154)

Puffer, Agarose und Geräte wie bei E.6.7.3. .

Eine entfettete Glasplatte (5x10 cm) wurde mit einer Mischung aus 10 ml Agarose-Lösung (56°C) und 1 ml Antiserum beschichtet. Nach Erkalten wurden an einer Schmalseite Löcher gestanzt, die Antigen-Lösungen eingefüllt und bei 1.5 V/cm in der Elektrophorese-Kammer 14-17 Stunden laufen gelassen (Marker: Bromphenolblau).

Weitere Behandlung wie bei E.6.7.3. Eine Quantifizierung von ECA ist wegen des diffusen Auslaufens der Rocketspitzen bei der ECA-Präzipitation mit dieser Methode nicht möglich.

6.8. Coomassie-Färbung (24)

Färbelösung:	5 mg Coomassie brilliant blue
	450 ml Äthanol 96%
	100 ml Eisessig
	450 ml H ₂ O

Entfärber:	wie Färbelösung ohne Coomassie blue.
------------	--------------------------------------

Die Gelplatten wurden 5-10 Minuten in die Färbelösung getaucht und anschließend im Entfärber bei mehrfachem Entfärber-Wechsel überschüssige Farbe entfernt (der Entfärber kann mit Aktivkohle regeneriert werden). Danach wurden die Gelplatten mit Warmluft getrocknet.

7. Lektin-Test

Durchführung wie Ouchterlony (E.6.7.1.).

Lektin-Lösungen 0.1% und 0.3%ig: Concanavalin A in halbgesättigter NaCl-Lösung und Wheat germ-Agglutinin in 0.005 M PBS, pH 7.2 .

8. Herkunft der Enzyme und Chemikalien

Boehringer, Mannheim	Phospholipase A ₂ EC 3.1.1.4 Lysozym EC 3.2.1.17
Calbiochem, La Jolla (Californien)	meth. Albumin
EGA-Chemie, Steinheim	Na-Cyanoborohydrid
Fluka AG, Buchs (Schweiz)	Carbodiimid
Litex, Glostrup (Däne- mark)	Litex-Agarose
Makor Chemical, Jerusalem (Israel)	Wheat germ Agglutinin

Merck, Darmstadt	Methyljodid Deuteromethyljodid DMSO HF NaBH ₄ NaBD ₄ D ₂ O Na-meta-perjodat
Miles-Yeda, Rehovoth (Israel)	Concanavalin A
Pharmacia, Heidelberg	Sephadex LH-20 Agarose A
Roth, Karlsruhe	Dithiothreitol 2-Aminopyridin Tris TCA
Serdary Research Lab., London (England)	Phosphatidylcholin Lysophosphatidylcholin
Serva, Heidelberg	Dipalmitin purriss. Protaminsulfat Poly-L-Lysin · HBr Na-Desoxycholat Triton X-100 p-Dimethylaminobenzaldehyd Dowex WX50 Katalase EC 1.11.1.6

Sigma, St.Louis (USA) Phospholipase A₂ EC 3.1.1.4.
Lipase EC 3.1.1.3.
L-Aminosäure-Oxidase EC 1.4.3.2.
 α - und β -Naphthylacetat
Fast Red TR
Histon II-S
Histon V-S
Histon VIII-S

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahamed, N.M., Radziejewska-Lebrecht, J., Widemann, Ch., Mayer, H.:
Reactivity of isolated lipopolysaccharides of enterobacterial R mutants with complete or incomplete core structures with lectins
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 247, 468-482 (1980)
2. Alphen, L. van,:
Architecture of the outer membrane of Escherichia coli: protein-lipoprotein interactions
Doktorarbeit, Rijksuniversiteit Utrecht (1979)
3. Aoki, S., Merkel, M., McCabe, W.R.:
Immunfluorescent demonstration of the common enterobacterial antigen
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 121, 230-234 (1966)
4. Bayer, M.E., Thurow, H.:
Polysaccharid capsule of Escherichia coli: microscope study of its size, structure, and sites of synthesis
J.Bacteriol 130, 911-936 (1977)
5. Beckmann, I., Lüderitz, O., Westphal, O.:
Zur Immunchemie der somatischen Antigene von Enterobacteriaceae
Biochem.Zeitschrift 339, 401-415 (1964)

6. Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., Svensson, S.:
Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden
Angew.Chemie 82, 643-674 (1970)
7. Bligh, E.G., Dyer, W.J.:
In: "Techniques of lipidology" Kates, M.
North-Holland Publ.Comp. Amsterdam-London, S. 349
(1972)
8. Braun, V., Rehn, K.:
Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the E. coli cell wall: the specific effect of trypsin on the membrane structure
Eur.J.Biochem. 10, 426-438 (1969)
9. Braun, V., Rehn, K., Wolff, H.:
Supramolecular structure of the rigid layer of the cell wall of Salmonella, Serratia, Proteus, and Ps. fluorescens. Number of lipoprotein molecules in a membrane layer
Biochemistry 9, 5041-5049 (1970)
10. Braun, V., Gnirke, H., Henning, U., Rehn, K.:
Model for the structure of the shape-maintaining layer of the Escherichia coli cell envelope
J.Bacteriol. 114, 1264-1270 (1973)

11. Braun, V., Hantke, K.:
Biochemistry of bacterial cell envelope
Ann.Rev.Biochem. 43, 89-121 (1974)

12. Braun, V., Rehn, K.:
Covalent lipoprotein from the outer membrane of
Escherichia coli
Biochem.Biophys.Acta 415, 335-377 (1975)

13. Brodhage, H.:
Harnstoffextrakte aus gram-negativen Bakterien in
der indirekten Hämagglutinationsreaktion
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 148, 94-104 (1962)

14. Brodhage, H.:
Harnstoffextrakte aus gram-negativen Bakterien in
der indirekten Hämagglutinationsreaktion
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 148, 208-213 (1962)

15. Brogren, C.-H., Børg-Hansen, T.C.:
Enzyme characterization in quantitative immunoelectro-
phoresis. An enzymological study of human serum ester-
ases
In: "Quantitative immunoelectrophoresis" Axelsen, N.H.
(ed.), Scand. J.Immunol., Suppl. 2, 37-51 (1975)

16. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (eds.) :
Bergey's manual of determinative bacteriology
8thed., Williams & Wilkins, Baltimore (1974)
17. Dankert, J., Hofstra, H.:
Antibodies against outer membrane proteins in
rabbit antisera against E. coli 026:K60
J.Gen.Microbiol. 104, 311-320 (1978)
18. Diaz, F., Neter, E.:
Antibody response to the common enterobacterial
antigen of children with shigellosis, salmonellosis
or urinary tract infection
Am.J.Med.Sci. 256, 18-24 (1968)
19. DiRienzo, J.M., Nakamura, K., Inouye, M.:
The outer membrane proteins of gram-negativ bacteria:
biosynthesis, assembly, and functions
Ann.Rev.Biochem. 47, 481-532 (1978)
20. Datta, D.B., Arden, B., Henning, U.:
Major proteins of the Escherichia coli outer cell
envelope membrane as bacteriophage receptors
J.Bacteriol. 131, 821-829 (1977)

21. Domingue, G.J., Salhi, A., Rountree, C., Little, W.:
Prevention of experimental hematogenous and retrograde
pyelonephritis by antibodies against enterobacterial
common antigen
Infect.Immun. 2, 175-182 (1970)
22. Domingue, G., Johnsson, E.:
Isolation of subcellular fractions containing immuno-
genic enterobacterial common antigen
Z.Immunitaetsforsch. 148, 23-38 (1974)
23. Dubois, M., Gilles, K.H., Hamilton, J.K., Rebers, P.A.,
Smith, R.:
Colorimetric method for determination of sugars and
related substances
Anal.Chem. 28, 350-356 (1956)
24. Fazekas, S., De St.Groth, F.S., Webster, R.G.,
Datyner, A.:
Two new staining procedures for quantitative estimation
of proteins on electrophoretic strips
Biochem.Biophys.Acta 71, 377-391 (1963)
25. Fischer, F.G., Nebel, H.J.:
Nachweis und Bestimmung von Glucosamin und Galaktos-
amin auf Papierchromatogrammen
Z.Physiol.Chem 302, 10-19 (1955)

26. Fleming, H.C.:

Vergleichende analytisch-chemische Untersuchungen
an O- und K-Antigenen einiger Vertreter der K-Anti-
genklasse B

Diplomarbeit, Freiburg (1972)

27. Fromme, I., Beilharz, H.:

Gas chromatographic assay of total and O-acetyl
groups in bacterial lipopolysaccharides

Anal.Biochem. 84, 347-353 (1978)

28. Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O.:

A new method for the extraction of R lipopoly-
saccharides

Eur.J.Biochem. 9, 245-249 (1969)

29. Galanos, C., Rietschel, E.Th., Lüderitz, O.,
Westphal, O., Kim, Y.B., Watson, D.B.:

Biological activities of lipid A complexed with bovine
serum albumin

Eur.J.Biochem. 31, 230-233 (1972)

30. Geyer, R., Galanos, C., Westphal, O., Golecki, J.R.:

A Lipopolysaccharide-binding cell-surface protein
from Salmonella minnesota

Eur.J.Biochem. 98, 27-38 (1979)

31. Glynn, A.A.:
Bacterial factors inhibiting host defense mechanism
In: "Microbial pathogenicity in man and animals",
Smith, H., Pearce, J.H. (eds.), Cambridge University Press, 129-155 (1972)
32. Gmeiner, I.:
Glyceraldehyde phosphate at the reducing terminus
of Salmonella O haptens
Eur.J.Biochem. 51, 449-457 (1975)
33. Gmeiner, J., Martin, H.H.:
Phospholipid and lipopolysaccharide in *Proteus mirabilis* and its stable protoplast L-form
Eur.J.Biochem. 67, 487-494 (1976)
34. Gruss, P., Gmeiner, J., Martin, H.H.:
Amino acid composition of the covalent rigidlayer
lipoprotein in cell walls of *Proteus mirabilis*
Eur.J.Biochem. 57, 411-414 (1975)
35. Hakomori, S.:
A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide
catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl
sulfoxide
J.Biochem. 55, 205-208 (1964)

36. Hammarström, S., Carlsson, H.E., Perlmann, P., Svensson, S.:
Immunochemistry of the common antigen of Enterobacteriaceae (Kunin)
J.Exp.Med. 134, 565-576 (1971)
37. Hanson, R.L., Kennedy, E.P.:
Energy-transducing adenosine triphosphatase from Escherichia coli: purification, properties, and inhibition by antibody
J.Bacteriol 114, 772-781 (1973)
38. Hase, S., Ikenaka, T., Matsushima, Y.:
Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound
Biochem.Biophys.Comm. 85, Nr.1, 257-263 (1978)
39. Hase, S., Ikenaka, T., Matsushima, Y.:
Analyses of oligosaccharides by tagging the reducing end with a fluorescent compound. I. Application to glycoproteins
J.Biochem. 85, 989-994 (1979)
40. Hindenach, I., Henning, U.:
The major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Preparative isolation of all major membrane proteins.
Eur.J.Biochem. 59, 207-213 (1975)

41. Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S.:
On the process of cellular division in *E. coli*: a
mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein
Proc.Natl.Acad.Sci. 74, 1417-1420 (1977)
42. Hirschfeld, J.:
Immunelectrophoresis procedure and application to
the study of group-specific variations in sera
Sci.Tools 7, 18-25 (1960)
43. Hofstee, B.H.J.:
Spectrophotometric determination of esterases
Science 114, 128-130 (1951)
44. Hofstra, H., Dankert, J.:
Antigenic cross-reactivity of major outer membrane
proteins in Enterobacteriaceae species
J.Gen.Microbiol. 111, 293-302 (1979)
45. Howard, J.G., Glynn, A.A.:
The virulence for mice of strains of *Escherichia coli*
related to the effects of K antigens on their resis-
tance to phagocytosis and killing by complement
Immunology 20, 767-777 (1971)
46. Humphrey, J.H., White, R.G.:
Immunology
Thieme-Verlag, Stuttgart (1971)

47. Ichihara, N., Ishimoto, N., Ito, E.:
Enzymatic incorporation of N-acetyl-D-mannosamin-
uronic acid and D-glucose into a polysaccharide of
Escherichia coli 014:K7:H⁻
FEBS Lett. 40, 309-311 (1974)
48. Inouye, M., Shaw, J., Shen, C.:
The assembly of a structural lipoprotein in the
envelope of E. coli
J.Biol.Chem. 247, 8154-8159 (1972)
49. Jann, K., Westphal, O.:
Microbial polysaccharides
In: "The antigens", Vol.III, Sela, M. (ed.),
Academic press Inc. London, 1-125 (1975)
50. Jones, N.C., Osborne, M.J.:
Translocation of phospholipids between the outer and
inner membranes of Salmonella typhimurium
J.Biol.Chem. 252, 7405-7412 (1977)
51. Kaback, H.R.:
Transport
Ann.Rev.Biochem. 39, 561-598 (1970)
52. Kaback, H.R.:
Transport across isolated bacterial cytoplasmic
membranes
Biochem.Biophys.Acta 265, 367-416 (1972)

53. Kabat, E.A., Mayer, M.M.:
Experimental Immunochemistry
2. Auflage, Kapitel 24, Thomas books, Springfield,
USA (1961)
54. Kaijser, B., Olling, S.:
Experimental hematogenous pyelonephritis due to
Escherichia coli in rabbits: the antibody response
and its protective capacity
J.Infekt.Dis. 128, 41-49 (1973)
55. Kaijser, B., Ahlstedt, S.:
Protective capacity of antibodies against E. coli
O and K antigens
Infekt.Immun. 17, 286-289 (1977)
56. Kałuzewski, S., Czech, Z.:
Występowanie i zawartość antygenów Kunina (CAE) w
pałeczkach Enterobacteriaceae oraz innych bakteriach
gramoujemnych
Med.Dosw.Mikrobiol. 28, 109-119 (1976)
57. Kauffmann, F., Vahlne, G.:
Über die Bedeutung der serologischen Formenwechsel
für die Bakteriophagenwirkung in der coli-Gruppe
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 22, 119-137 (1945)

58. Kauffmann, F.:
The bacteriology of Enterobacteriaceae
Munksgaard, Kopenhagen (1966)
59. Kawamura, T., Ichihara, N., Ishimoto, N., Ito, E.:
Biosynthesis of uridine diphosphate N-acetyl-D-mannos-
aminuronic acid from uridine diphosphate N-acetyl-D-
glucosamine in *Escherichia coli*: separation of enzyme
responsible for epimerization and dehydrogenation
Biochem.Biophys.Res.Comm. 66, 1506-1512 (1975)
60. Kessler, R.E., Shockman, G.D.:
Enzymatic deacylation of lipoteichoic acid by proto-
plasts of *Streptococcus faecium*
J.Bacteriol. 137, Nr.3, 1176-1179 (1979)
61. Kickhöfen, B., Warth, R.:
Eine Trennkammer für die Hochspannungs-Elektropho-
rese nach dem Michl'schen Prinzip
J.Chrom. 33, 558-560 (1968)
62. Kiss, P., Rinno, J., Schmidt, G., Mayer, H.:
Structural studies on the immunogenic form of the
enterobacterial common antigen
Eur.J.Biochem. 88, 211-218 (1978)

63. Kunin, C.M., Beard, M.V., Halmagyi, N.E.:
Evidence for a common hapten associated with endo-
toxin fractions of *E. coli* and other Enterobacteriaceae
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 111; 160-166 (1962)
64. Kunin, C.M.:
Separation, characterization, and biological signi-
ficance of a common antigen in Enterobacteriaceae
J.Exp.Med. 118, 565-586 (1963)
65. Leive, L., Shovlin, V., Mergenhagen, S.E.:
Physical, chemical, and immunological properties of
lipopolysaccharide released from *Escherichia coli*
by ethylenediaminetetraacetate
J.Biol.Chem. 243, 6384-6391 (1968)
66. Lew, H.C., Nikaido, H., Mäkelä, P.H.:
The biosynthesis of uridine diphosphate N-acetylmannos-
aminuronic acid in rff mutants of *Salmonella typhi-*
murium
J.Bacteriol. 136, 227-233 (1978)
67. Lindberg, B., Lönngren, J., Thompson, J.L.:
Degradation of polysaccharides containing uronic
acid residues
Carbohydr.Res. 28, 351-357 (1973)

68. Lüderitz, O., Galanos, C., Risse, H.J., Ruschmann, E., Schlecht, S., Schmidt, G., Schulte-Holthausen, H., Wheat, R., Westphal, O., Schlosshardt, J.:
Structural relationships of Salmonella O and R antigens
Ann.N.Y.Acad.Science 133, 349-374 (1966)
69. Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Nurminen, M., Rietschel, E.Th., Rosenfelder, G., Simon, M., Westphal, O.:
Lipid A: chemical structure and biological activity
J.Infect.Dis. 128, 17-29 (1973)
70. Żugowski, C., Romanowska, E.:
Enterobacterial common antigen: Isolation from Shigella sonnei, purification and immunochemical characterization
Eur.J.Biochem. 91, 89-97 (1978)
71. Lugtenberg, B., Bronstein, H., van Selm, N., Peters, R.:
Peptidoglycan-associated outer membrane proteins in gram-negative bacteria
Biochem.Biophys.Acta 465, 571-578 (1977)
72. Mäkelä, P.H., Jähkola, M., Lüderitz, O.:
A new gene cluster rfe concerned with the biosynthesis of Salmonella lipopolysaccharide
J.Gen.Microbiol. 60, 91-106 (1970)

73. Mäkelä, P.H., Mayer, H., Whang, H.Y., Neter, E.:
Participation of lipopolysaccharide genes in the
determination of the common enterobacterial antigen:
analysis of R mutants of *S. minnesota*
J.Bacteriol. 119, 760-764 (1974)
74. Mäkelä, P.H., Mayer, H.:
Participation of lipopolysaccharide genes in the
determination of the enterobacterial common antigen:
analysis in *Salmonella* groups B and C
J.Bacteriol. 119, 765-770 (1974)
75. Mäkelä, P.H., Mayer, H.:
Enterobacterial common antigen
Bact.Rev. 40. Nr.3, 591-632 (1976)
76. Mäkelä, P.H., Schmidt, G., Mayer, H., Nikaido, H.,
Whang, H.Y., Neter, E.:
Enterobacterial common antigen in rfb deletion mutants
of *Salmonella typhimurium*
J.Bacteriol. 127, 1141-1149 (1976)
77. Mäkelä, P.H., Stocker, B.A.D.:
Genetics of the bacterial cell surface
In: "Genetic as a tool in microbiology", Glover, S.
(ed.), 31st Symp. Soc.Gen.Microbiol. (in Druck)

78. Männel, D.:
Isolierung und Charakterisierung des Common Antigen
der Enterobacteriaceae
Inaugural-Dissertation, Freiburg (1976)
79. Männel, D., Mayer, H.:
Isolation and chemical characterization of the
enterobacterial common antigen
Eur.J.Biochem. 86, 361-370 (1978)
80. Männel, D., Mayer, H.:
Serological and immunological properties of isolated
enterobacterial common antigen
Eur.J.Biochem. 86, 371-379 (1978)
81. Männel, D., Mäkelä, P.H., Mayer, H.:
Enterobacterial common antigen in mutant strains of
Salmonella
J.Bacteriol. 135, 348-353 (1978)
82. Malkamäki, M.:
Antibodies to the enterobacterial common antigen
(ECA): Standardization of the method and levels
in normal sera
J.Clin.Microbiol. (1981)

83. Markham, J.L., Knox, K.W., Wicken, A.J., Hewett, M.J.:
Formation of extracellular LTA by oral Streptococci
and Lactobacilli
Infect.Immun. 12, 378-386 (1975)
84. Marx, A., Mayer, H.:
The action of phospholipase A on the enterobacterial
antigen of the Kunin-type
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 226, 224-231 (1974)
85. Marx, A., Petcovici, M.:
Immunochemical studies on purified common entero-
bacterial antigen
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 233, 486-494 (1975)
86. Mayer, H.:
D-Mannosaminuronsäure-Baustein des K7-Antigens von
Escherichia coli
Eur.J.Biochem. 8, 139-145 (1969)
87. Mayer, H., Schmidt, G.:
Hämagglutinine gegen ein gemeinsames Enterobacteria-
ceae -Antigen in E. coli R1-Antiseren
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 216, 299-313 (1971)

88. Mayer, H., Schmidt, G.:
The occurrence of three different lipopolysaccharide
cores in Shigella and their relationship to known
enterobacterial core types
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 224, 345-354 (1973)
89. Mayer, H., Schmidt, G.:
Chemistry and biology of the enterobacterial common
antigen (ECA)
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 85, 99-153 (1979)
90. Mayer, H., Kuhn, H.-M., Warth, R.:
The enterobacterial common antigen as an example of
hexosaminuronic acid containing microbial surface
antigens
Vortrag, EUCHEM Conference on Polysaccharides from
Microorganisms, Stockholm (1979)
91. McLafferty, F.W.:
Decompositions and rearrangements of organic ions
In: "Mass spektrometry of organic ions", McLafferty,
F.W. (ed.), Acad.Press New York, S. 309 (1963)
92. Mühlradt, P.F., Menzel, J., Golecki, J.R. Speth, V.:
Outer membrane of Salmonella. Sites of export of
newly synthesised lipopolysaccharide on the bacterial
surface
Eur.J.Biochem. 35, 471-481 (1973)

93. Mittal, K., Ricciard, I.D., Tizard, I.R.:
Indirekt hemagglutination employing enterobacterial
common antigen and Yersinia somatic antigen
- Technique to differentiate Brucellosis from infections involving cross-reacting Yersinia enterocolitica
J.Clin.Microbiol. 11, Nr.2, 149-152 (1980)
94. Nakamura, K., Pirtle, R.M., Inouye, M.:
Homology of the gene coding for outer membrane lipoprotein within various gram-negative bacteria
J.Bacteriol. 137, Nr.1, 595-604 (1979)
95. Neter, E.:
Bacterial hemagglutination and hemolysis
Bact.Rev. 20, 166-188 (1956)
96. Neter, E., Whang, H.Y., Suzuki, T., Gorzynski, E.A.:
Differences in antibody response of rabbit to intravenously injected soluble and cell-attached enterobacterial antigen
Immunology 7, 657-664 (1964)
97. Neter, E., Gorzynski, E.A., Westphal, O., Lüderitz, O., Klumpp, D.J.:
The effects of protamine and histone on enterobacterial lipopolysaccharides and hemolysis
Can.J.Microbiol. 4, 371-383 (1958)

98. Neter, E., Kennedy, E.A., Jewett Jr., Th.C.:
Antibody response to common enterobacterial antigen
of children with pyogenic peritonitis
Infection 1, 12-16 (1973)
99. Neter, E., Merrin, C., Surgalla, M.J., Wajzman, Z.:
Shigella sonnei bacteremia - Unusual antibody
response from immunosuppressive therapy following
renal transplantation
Urology 4, 198-200 (1974)
100. Neu, H.C., Heppel, L.A.:
The release of enzymes from *Escherichia coli* by
osmotic shock and during the formation of sphero-
plasts
J.Biol.Chem. 240, 3685-3692 (1965)
101. Nikaido, H.:
Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Trans-
membrane diffusion of some hydrophobic substances
Biochem.Biophys.Acta 433, 118-132 (1976)
102. Nikaido, H.:
Die Permeabilität der äußeren Membran
Angew.Chem. 91, 394-407 (1979)

103. Nikaido, H., Nakae, T.:
The outer membrane of gram-negative bacteria
Adv.Microbiol.Physiol. 20, 163-240 (1979)
104. Nishijima, M., Nakaike, S., Tamori, Y., Nojima, S.:
Detergent-resistant phospholipase A of *Escherichia coli* K-12
Eur.J.Biochem. 73, 115-124 (1977)
105. Odham, G., Stenhagen, E.:
Complex lipids
In: "Biochemical applications of mass spectrometry",
Waller, G.R. (ed.), Kapitel 9, Wiley-Interscience,
New York (1972)
106. Ohki, M., Doi, O., Nojima, S.:
Mutant of *Escherichia coli* K-12 deficient for detergent-resistant phospholipase A
J.Bacteriol. 110, 864-869 (1972)
107. Olins, A.L., Warner, R.C.:
Physicochemical studies on a lipopolysaccharide from the cell wall of *Azotobacter vinelandii*
J.Biol.Chem. 242, 4994-5001 (1967)

108. Olson, P.:
A simple technique for the inactivation of IgM-antibodies using dithiothreitol
Vox.Sang. 30, 149-159 (1976)
109. Ørskov, I., Ørskov, F., Jann, B., Jann, K.:
Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*
Bact.Rev. 41, Nr.3, 667-710 (1977)
110. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., Carson, E.:
Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane
J.Biol.Chem. 247, 3962-3972 (1972)
111. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E.:
Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Site of synthesis of lipopolysaccharide
J.Biol.Chem. 247, 3973-3986 (1972)
112. Ouchterlony, Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
Prog.Allergy 5, 1-77 (1958)

113. Oxender, D.L.:
Membrane transport
Ann.Rev.Biochem. 41, 777-814 (1972)
114. Perkins, H.R.:
A polymer containing glucose and aminohexuronic acid
isolated from the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*
Biochem.J. 86, 475-483 (1963)
115. Pump, K., Vertenyi, A.:
Testing for antibodies with enterobacterial common
antigen (ECA) in childhood pyelonephritis
Acta.Paed.Acad.Sci.Hung. 19, Nr.4, 351-355 (1978)
116. Raetz, Ch.R.H.:
Enzymology, genetics, and regulation of membrane
phospholipid synthesis in *Escherichia coli*
Microbiol.Rev. 42, Nr.3, 614-659 (1978)
117. Ray, A., Nemethy, G.:
A difference spectrophotometric method for the deter-
mination of critical micelle concentrations
J.Phys.Chem. 75, Nr.6, 804-808 (1971)

118. Rinno, J.:
Die immunogene Form des Enterobacterial Common Antigen.
Untersuchungen zur Lokalisation in der Zellhülle und
zur Bindung an Lipopolysaccharid von E. coli R1- und
R4-Mutanten
Inaugural-Dissertation, Freiburg (1979)
119. Rinno, J., Golecki, J.R., Mayer, H.:
Localization of enterobacterial common antigen:
Immunogenic and non-immunogenic ECA-containing E. coli
J.Bacteriol. 141, Nr.2, 814-821 (1980)
120. Rondle, C.J., Morgan, W.T.:
The determination of glucosamine and galactosamine
Biochem.J. 61, 586-589 (1955)
121. Rotering, H., Braun, V.:
Evidence for the action of a phosphatidylglycerol-
specific lipase during spheroplast formation of
E. coli cells
Abstract, FEMS-Symposium on microbial envelopes,
Helsinki (1980)
122. Roth, K.L., Frumin, A.M.:
In vitro differentiation between auto- and iso-
immune antibodies by protamine and trypsin
Science 120, 945-946 (1954)

123. Rydczynski, A.B., Jackson, R.W.:
The properties of a lipoteichoic acid antigen from
Streptococcus pyogenes
Immunochemistry 15, 83-91 (1978)
124. Ryhage, R., Ställberg-Stenhagen, S., Stenhagen, E.:
Mass spectrometric studies. VII. Methyl esters of
 α , β -unsaturated long-chain acids. On the structure
of C_{27} -phthienoic acid
Arkiv for Kemie 18, 179-194 (1962)
125. Salton, M.R.J.:
Bacterial membranes
Crit.Rev.Microbiol. 1, 161-197 (1971)
126. Salton, M.R.J.:
Molecular bacteriology
In: "Molecular bacteriology", Kwapinsky, J.B.G.
(ed.), Wiley & Sons, New York, 387-421 (1974)
127. Scandella, C.J., Kornberg, A.:
A membrane-bound phospholipase A1 purified from
Escherichia coli
Biochemistry 10, 4447-4456 (1971)
128. Scheidegger, J.J.:
Une microméthode de l'immuno-electrophorèse
Int.Arch.Allergy 7, 103-110 (1955)

129. Schlecht, S., Ring, K., Kutscher, J., Eschweiler, W.:
Ein neuer Laboratoriumsfermenter zur Züchtung von
Mikroorganismen im turbidostatischen, chemostatischen
und "batch"-Verfahren
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 206. 246-258 (1968)
130. Schleifer, K.H., Kandler, O.:
Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their
taxonomic implications
Bac.Rev. 36, 407-477 (1972)
131. Schmidt, G., Männel, D., Mayer, H., Whang, H.Y.,
Neter, E.:
The role of a lipopolysaccharide gene for immuno-
genicity of the enterobacterial common antigen
J.Bacteriol. 126, 579-586 (1976)
132. Schmidt, G., Mayer, H., Mäkelä, P.H.:
Presence of rfe genes in Escherichia coli: their
participation in biosynthesis of O antigen and
enterobacterial common antigen
J.Bacteriol. 127, 755-762 (1976)
133. Schnaitman, C.A.:
Comparison of the envelope protein composition
of several gram-negative bacteria
J.Bacteriol. 104, 1404-1405 (1970)

134. Schulman, H., Kennedy, E.:
Localization of membrane-derived oligosaccharides
in the outer envelope of *Escherichia coli* and their
occurrence in other gram-negative bacteria
J.Bacteriol. 137, 686-688 (1979)
135. Shaw, N.:
Bacterial glycolipids and glycopospholipids
In: "Advances in microbial physiology", Rose, A.H.,
Tempest, D.W. (eds.), Acad.Press London-N.Y.,
Nr.12, 141-167 (1975)
136. Smit, J., Kamio, Y., Nikaido, H.:
Outer membrane of *Salmonella typhimurium*:
chemical analysis and freeze-fracture studies
with lipopolysaccharide mutants
J.Bacteriol. 124, 942-958 (1975)
137. Stahl, E. (ed.):
Dünnschichtchromatographie
Springer-Verlag, Berlin, S. 369 (1962)
138. Starr, M.P., Mandel, M.:
DNA base composition and taxonomy of phytopatho-
genic and other *Enterobacteria*
J.Gen.Microbiol. 56, 113-123 (1969)

139. Stewart, J.Ch.M.:
Colorimetric determination of phospholipids with
ammonium ferrothiocyanate
Anal.Biochem. 104, 10-14 (1980)
140. Stock, J.B., Ranch, B., Roseman, S.:
Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and
Escherichia coli
J.Biol.Chem. 252, 7850-7861 (1977)
141. Stocker, B.A.D., Mäkelä, P.H.:
Genetic aspects of biosynthesis and structure of
Salmonella lipopolysaccharide
In: "Microbial toxins", Weinbaum, G., Kadis, S.,
Aijl, S.J. (eds.), Vol. V, 369-438, Acad.Press.
New York (1971)
142. Strominger, J.L., Tipper, D.J.:
Bacterial cell wall
In: "Comprehensive biochemistry", 26A, 53-109
(1968)
143. Suzuki, T., Gorzynski, E.A., Neter, E.:
Separation by ethanol of common and somatic anti-
gens of Enterobacteriaceae
J.Bacteriol. 88, 1240-1243 (1964)

144. Suzuki, T., Whang, H.Y., Gorzynski, E.A., Neter, E.:
Inhibition by lipopolysaccharide (endotoxin) of
antibody response of rabbit to common antigen of
Enterobacteriaceae
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 117, 785-789 (1964)
145. Suzuki, T., Whang, H.Y., Neter, E.:
Studies of common antigen of Enterobacteriaceae
with particular reference to Escherichia coli 014
Ann.Immunol.Hung. 9, 283-292 (1966)
146. Svendsen, P.J.:
Fused rocket immunoelectrophoresis
In: "Quantitative Immunoelectrophoresis", Axelsen,
N.H., Krøll, J., Weeke, B. (eds.), Scand. J.
Immunol., Suppl.1, 69-70 (1973)
147. Szewczyk, B., Taylor, A.:
Immunochemical properties of Vi antigen from
Salmonella typhi T2: presence of two antigenic
determinants
Infect.Immun. 29, Nr.2, 539-544 (1980)
148. Tate, W.J., Douglas, H., Brande, A.J.:
Protection against lethality of E. coli endotoxin
with O-antiserum
Ann.NY.Acad.Sci. 133, 746-762 (1966)

149. Taylor, R.L., Conrad, H.E.:
Stoichiometric depolymerization of polyuronides
and glucosaminoglucurans to monosaccharides fol-
lowing reduction of their carbodiimid activated
carboxyl-groups
Biochem. 11, 1383-1388 (1972)
150. Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Harrison, J.S.:
Detection of sugars on paper chromatograms
Nature 166, 444-445 (1950)
151. Turunen, U., Malkamäki, M., Valtonen, V.V.,
Larinkari, U., Pikkarainen, P., Salaspuro, M.P.,
Mäkelä, P.H.:
Endotoxin and liver diseases- high titers of
enterobacterial common antigen antibodies in
patients with alcoholic cirrhosis
Lancet (1981)
152. Verkleij, A., van Alphen, L., Bijvelt, J.,
Lugtenberg, B.:
Architecture of the outer membrane of Escherichia
coli K-12. II. Freeze fracture morphology of wild-
type and mutant strains
Biochem.Biophys.Acta 466, 269-282 (1977)
153. Weckesser, J., Drews, G., Mayer, H.:
Lipopolysaccharides of photosynthetic prokaryotes
Ann.Rev.Microbiol. 33, 215-239 (1979)

154. Weeke, B.:
Rocket immunoelectrophoresis
In: "Quantitative Immunoelectrophoresis", Axelsen,
N.H., Krøll, J., Weeke, B. (eds.), Scand.J.
Immunol., Suppl.1, 37-46 (1973)
155. Weeke, B.:
Crossed immunoelectrophoresis
In: "Quantitative Immunoelectrophoresis", Axelsen,
N.H., Krøll, J., Weeke, B. (eds.), Scand.J.
Immunol., Suppl.1, 47-56 (1973)
156. Weigand, R.A., Vinci, K.D., Rothfield, L.J.:
Morphogenesis of bacterial division septum: a
new class of septation-defective mutant
Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 1882-1886 (1976)
157. Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, F.:
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/
Wasser
Z.Natur.Forsch. 7, 148-155 (1952)
158. Whang, H.Y., Neter, E.:
Immunochemical studies of a heterogenetic entero-
bacterial antigen (Kunin)
J.Bacteriol. 84, 1245-1250 (1962)

159. Whang, H.Y., Neter, E.:
Study of heterogenetic (Kunin) antibodies in
serum of healthy subjects and children with en-
teric and urinary tract infections
J.Pediatr. 63, 412-419 (1963)
160. Whang, H.Y., Neter, E.:
Selective destruction by *Pseudomonas aeruginosa*
of common antigen of Enterobacteriaceae
J.Bacteriol. 88, 1244-1248 (1964)
161. Whang, H.Y., Neter, E.:
Immunosuppression by endotoxin and its lipid A
component
Proc.Soc.Biol.Med. 124, 919-924 (1967)
162. Whang, H.Y., Jagi, Y., Neter, E.:
Characterization of rabbit antibodies against
common bacterial antigens and their presence in
the fetus
Int.Arch.Allergy 32, 353-365 (1967)
163. Whang, H.Y., Neter, E.:
Inhibition by cardiolipin of the antibody response
to bacterial antigens
J.Immunol. 100, 501-506 (1968)

164. Whang, H.Y., Neter, E.:
Antigen-associated immunosuppressant: effect of
serum on immune response
Science 163, 290-291 (1969)
165. Whang, H.Y., Mayer, H., Neter, E.:
Differential effects on immunogenicity and anti-
genicity of heat, freezing and alkali treatment
of bacterial antigens
J.Immunol. 106, 1552-1558 (1971)
166. White, D.A., Albright, F.R., Lennarz, W.J.,
Schnaitman, C.A.:
Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes
in the wall and membrane subfractions of the en-
velope of Escherichia coli
Biochem.Biophys.Acta 249, 636-642 (1971)
167. Wicken, A.J., Gibbens, J.W., Knox, K.W.:
Comparative studies on the isolation of membrane
lipoteichoic acid from Lactobacillus fermenti
J.Bacteriol. 113, 365-372 (1973)
168. Wicken, A.J., Knox, K.W.:
Lipoteichoic acids: a new class of bacterial anti-
gen
Science 187, 1161- 1167 (1975)

169. Wicken, A.J., Knox, K.W.:

Bacterial cell surface amphiphiles

Biochem.Biophys.Acta 604, 1-26 (1980)

Lebenslauf

13.08.1950	in Wuppertal als Tochter der Artisten Hans Kuhn und Helena Kuhn, geb. Webers, geboren
1957-1965	Besuch der kath. Volksschule am Erfurter Weg in Düsseldorf
1965-1967	Besuch der Aufbaurealschule für Mädchen an der Franklinstraße in Düsseldorf
1967-1970	Besuch des Aufbaugymnasiums für Realschulabsolventen am Bonnehof in Düsseldorf
Wintersemester 1970/71	Beginn des Biologiestudiums an der Freien Universität Berlin
Wintersemester 1971/72	Universität Hamburg
Sommersemester 1972 bis Wintersemester 1973/74	Freie Universität Berlin
ab Sommersemester 1974	Georg-August-Universität Göttingen
18.05.1977	Diplomhauptprüfung

Die vorliegende Arbeit führte ich von November 1977 bis Januar 1981 am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg i.Br. durch.

